

Das Repressorprotein GvpD

aus *Haloferax mediterranei*:

Interaktion mit GvpE und
Analyse der Quartärstruktur

vom Fachbereich Biologie der
Technischen Hochschule Darmstadt
zur
Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium
genehmigte

DISSERTATION

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Sandra Scheuch
aus Groß-Gerau

- | | |
|------------------------|--|
| 1. Berichterstatterin: | Prof. Dr. Felicitas Pfeifer
Mikrobiologie, TU Darmstadt |
| 2. Berichterstatter: | PD Dr. Arnulf Kletzin
Mikrobiologie, TU Darmstadt |

Tag der Einreichung: 07.08.2007

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2007

Darmstadt 2007

D17

:Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer für die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen, für die stetige Unterstützung, viele hilfreiche Diskussionen und Denkanstöße, die Freiheit bei der Durchführung der Arbeit und für ein immer offenes Ohr.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Arnulf Kletzin für seine Hilfe bei jeglichen Problemen im Labor und am Computer, für die Hilfe bei der Bedienung der FPLC und der Identifizierung von PitA, die wertvolle Unterstützung bei allen proteinchemischen und bioinformatischen Fragen sowie seine unermüdliche Geduld.

Ein großes Dankeschön geht an meine Arbeitskollegen Katharina Teufel, Dr. Simone Sartorius-Neef und Torsten Hechler für konstruktive Diskussionen, ihre Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre im Halo-Labor. Besonders bei Katharina bedanke ich mich für den regen Gedankenaustausch über Interaktionsexperimente. Bei Dr. Peter Zimmermann möchte ich mich für die Hilfe am Beginn meiner Arbeit bedanken. Auch allen ehemaligen Diplomanden sowie Larissa und Miriam gilt ein Dankeschön für die gute Stimmung im Halo-Labor.

Ein dickes Dankeschön geht an Gaby Liebing, Renate Fröhlich und Karin Faist für das angenehme Arbeitsklima, ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung sowie ihr Wirken für das ganze Labor. Auch bei Nam-Suk Polin, Cordula Bernhard und Karin Papalau möchte ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Unterstützung bedanken. Die morgendliche Begrüßung durch unsere Frühaufsteher Gaby, Renate, Karin und Nam-Suk wird mir fehlen.

Auch Sabrina Fröls und Andreas Veith sowie meinen ehemaligen Kollegen Dr. Karin Lauber, Dr. Tim Urich, Fabian Müller und allen früheren Mitgliedern der AG Schleper gilt ein Dank für viele hilfreiche Gespräche und das nette Arbeitsklima.

Bei Martina Bauer und Kerstin Effenberger bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen ihres Forschungspraktikums.

Ein weiterer Dank geht an die Studenten Ina Schmidt, Aline Johann und Dennis Petrasch für die Mitarbeit während ihres Großpraktikums.

Bei Reinhard Mentele (AG Dr. Friedrich Lottspeich, MPI Martinsried) bedanke ich mich für die Durchführung der N-terminalen Sequenzierung des PitA-Proteins.

Allen Mitgliedern der AG Heider gilt ein Dank für die gute Zusammenarbeit. Vor allem bei Tamara Heß, Marie Lippert und Miryam Fischer möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und nette Gespräche bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Hans Ulrich Göringer bedanke ich mich für die Möglichkeit zur Benutzung des IAsys-Affinitätssensors und bei Moritz Niemann für die Hilfe bei der Durchführung der Messungen.

Ein ganz großer Dank gilt meinen Eltern für ihre Unterstützung und ihre Geduld. Danke für unzählige Ermutigungen und alles, was Ihr für mich getan habt.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	4
2.1 Halobakterien und halophile Anpassung	4
2.2 Halophile Proteine.....	6
2.3 Gasvesikel und Gasvesikel-kodierende Genregion bei Halobakterien	10
2.4 Transkription und Transkriptionsregulatoren in Archaea.....	13
2.5 Der Transkriptionsaktivator GvpE.....	15
2.6 GvpD - involviert in die Repression der Gasvesikelbildung.....	17
2.7 Zielsetzungen der Arbeit.....	21
3. Material und Methoden.....	22
3.1 Material	22
3.1.1 Chemikalien und Hilfsmittel.....	22
3.1.2 Enzyme und Kits.....	23
3.1.3 Größenstandards.....	23
3.1.4 Synthetische Oligonukleotide.....	24
3.1.5 Verwendete Mikroorganismen	25
3.1.6 Verwendete Plasmidvektoren (Antibiotika-Resistenzen).....	25
3.2 Molekularbiologische Methoden	25
3.2.1 Wachstumsbedingungen	25
3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
3.2.3 <i>In vitro</i> -Mutagenese-PCR	26
3.2.4 Molekularbiologische Standardtechniken.....	27
3.2.5 Sequenzbestimmung von DNA-Fragmenten	27
3.2.6 Konstrukte für die Transformation von <i>E. coli</i>	28
3.2.7 Transformation von <i>Hfx. volcanii</i> WFD11.....	29
3.2.8 Konstrukte für die Transformation von <i>Hfx. volcanii</i> WFD11.....	29
3.2.9 Plasmidisolierung aus <i>Hfx. volcanii</i>	33
3.2.10 Nachweis von DNA-Fragmenten mittels Southern-Analyse.....	34
3.2.11 Isolierung von Gesamt-RNA aus Halobakterien	35
3.2.12 Northern-Analyse.....	35
3.3 Biochemische Methoden	37
3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	37
3.3.2 Trichloressigsäure (TCA)-Fällung.....	37
3.3.3 Analyse der BgaH-Aktivität (ONPG-Test)	37
3.3.4 N-terminale Sequenzierung	38
3.3.5 Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese	38
3.3.6 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen.....	38

3.3.7	Blotten von Proteinen.....	39
3.3.7.1	Nachweis von Proteinen mittels Western-Analyse.....	39
3.3.7.2	Semidry-Blot	40
3.3.8	Isolierung und Reinigung von Proteinen	40
3.3.8.1	Isolierung von Proteinen aus <i>Hfx. volcanii</i> für Western-Analysen.....	40
3.3.8.2	Isolierung von Proteinen aus <i>Hfx. volcanii</i> für <i>in vitro</i> -Studien	40
3.3.8.3	Rekombinante Expression und Reinigung von Gvp _{his} -Proteinen aus <i>E. coli</i> M15.....	41
3.3.8.4	Native Expression und Reinigung von Gvp _{his} -Proteinen aus <i>Hfx. volcanii</i> WFD11	42
3.3.8.5	Rekombinante Expression und Reinigung von <i>Strep</i> -Gvp-Proteinen aus <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.....	43
3.3.9	Protein-Protein-Interaktionsstudien.....	46
3.3.9.1	Affinitätschromatographie mit gebundenen Gvp _{his} -Proteinen und halobakteriellen Lysaten	46
3.3.9.2	Affinitätschromatographie mit gebundenen Gvp _{his} -Proteinen und <i>Strep</i> -Gvp-Proteinen.....	47
3.3.10	Methoden zur Untersuchung der Quartärstruktur von Proteinen	48
3.3.10.1	Native Polyacrylamidgelelektrophorese.....	48
3.3.10.2	Gelfiltration.....	48
3.3.10.3	Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation	49
4.	Ergebnisse	51
4.1	Untersuchung der Interaktionsfähigkeit verschiedener mcGvpD-Deletionsmutanten mit mcGvpE	51
4.1.1	Herstellung von mcGvpD-Deletionsmutanten und Untersuchung ihrer repressorischen Funktion	52
4.1.2	Interaktionsstudien der mcGvpD-Deletionsmutanten mit mcGvpE	56
4.1.3	Interaktionsstudien mit gereinigten Gvp _{his} - und <i>Strep</i> -Gvp-Proteinen.....	59
4.1.3.1	Klonierung verschiedener <i>gvp</i> -Gene in den <i>Strep</i> -tag-Expressionsvektor pPR-IBA2 ⁺	59
4.1.3.2	Produktion und Reinigung von <i>Strep</i> -Gvp-Proteinen aus <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	59
4.1.3.3	Interaktionsstudien mit gereinigten mcGvpD _{his} - und <i>Strep</i> -Gvp-Proteinen	61
4.2	<i>In vivo</i> -Studien zur Untersuchung der mcGvpD-induzierten Reduktion der GvpE-Proteinmenge.....	62
4.2.1	Herstellung des Expressionvektors pWL _{fdx} durch Inserierung des <i>fdx</i> -Promotors in pWL102 ...	64
4.2.2	Untersuchung der GvpE- und mcGvpD-Proteinmengen in E ^{ex} +mcD _{Mut} ^{ex} - <i>Hfx. volcanii</i> -Transformanten	66
4.2.3	Indirekte quantitative Analyse der mcGvpD-vermittelten Reduktion der mcGvpE-Proteinmenge durch Ermittlung der <i>P_{mcA}</i> -Promotoraktivität	71
4.2.4	<i>In vivo</i> -Studien mit D ^{ex} +cE _{Mut} ^{ex} -Transformanten zur Ermittlung der Funktion konservierter Aspartatreste im cGvpE-Protein	75
4.3	Untersuchungen zur Quartärstruktur von mcGvpD	78
4.3.1	Native Produktion und Reinigung von Gvp _{his} -Proteinen aus <i>Hfx. volcanii</i> WFD11.....	78
4.3.2	Identifizierung eines ca. 60 kDa Proteins X aus <i>Hfx. volcanii</i> WFD11 als PitA	82
4.3.3	Native Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Analyse von Gvp _{his} -Proteinen.....	84
4.3.4	Gelfiltration (Superose 6) von Gvp _{his} -Proteinen	90
4.3.4.1	Gelfiltration (Superose 6) von mcGvpD _{his} und PitA.....	91
4.3.4.2	Gelfiltration (Superose 6) von mcGvpE _{his} und cGvpE _{his}	94
4.3.5	Sedimentation von mcGvpD _{his} und PitA in einem Saccharose-Dichtegradienten	98

5. Diskussion.....	102
5.1 Untersuchung der Interaktionsfähigkeit verschiedener mcGvpD-Deletionsmutanten mit mcGvpE	103
5.2 <i>In vivo</i> -Studien zur Untersuchung der mcGvpD-induzierten Reduktion der GvpE- Proteinmenge.....	105
5.3 Untersuchungen zur Quartärstruktur von mcGvpD	111
5.3.1 Native Polyacrylamidgelelektrophorese von Gvp _{his} -Proteinen und PitA.....	112
5.3.2 Gelfiltration von Gvp _{his} -Proteinen und PitA	113
5.3.3 Saccharose-Dichtengradientenzentrifugation von mcGvpD _{his} und PitA	115
5.4 Abschließende Betrachtung und Ausblick	116
 6. Literaturverzeichnis.....	 118
 7. Anhang.....	 126
7.1 Sekundärstrukturvorhersage für mcGvpD	126
7.2 Multiple Alignierung von GvpD, RadA- und KaiC-Aminosäuresequenzen	127
7.3 Verteilung saurer und basischer Aminosäuren im mcGvpD-Protein	129
7.4 Hydrophobizitätsplot von mcGvpD nach Kyte & Doolittle (1982)	129
7.5 Abkürzungen.....	130
7.6 Lebenslauf	132
7.7 Erklärung.....	133

1. Zusammenfassung

Die Regulation der Gasvesikelbildung in halophilen Archaea wird durch mindestens zwei Proteine gewährleistet: GvpE ist ein Transkriptionsaktivator, der einem basischen Leucizipper-Protein ähnelt, und GvpD ist an der Repression der Gasvesikelbildung beteiligt. Das GvpD-Protein weist in seiner Aminosäuresequenz ein *p-loop*-Motiv und zwei basische Regionen auf, die für seine Funktionalität entscheidend sind. Eine Interaktion der beiden Proteine mcGvpE und mcGvpD aus *Haloferax mediterranei* war bereits bekannt sowie eine Bindung von ATP an mcGvpD. Auch führt die gleichzeitige Anwesenheit von mcGvpD und mcGvpE in *Haloferax volcanii*-Transformanten zu einer starken Reduktion der mcGvpE-Menge und könnte somit den negativen Regulationsmechanismus der Gasvesikelbildung darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Deletionsmutanten des mcGvpD-Proteins hergestellt, um den mcGvpE-Interaktionsbereich genauer zu lokalisieren. Durch Bindungsstudien mit Deletionsmutanten im *p-loop*-Motiv konnte eine Beteiligung dieser Region an der Interaktion mit mcGvpE ausgeschlossen werden. Analysen mit weiteren mcGvpD-Deletionsmutanten zeigten, dass weder die N-terminale Region noch die C-terminale Region an der Interaktion mit mcGvpE beteiligt sind, sondern eher ein zentraler Bereich des Proteins.

Der reduzierende Effekt von mcGvpD auf die Menge des mcGvpE-Proteins (oder auf das cGvpE-Protein von *Halobacterium salinarum*) wurde ebenfalls in *Hfx. volcanii*-Transformanten näher untersucht, um die hierfür notwendigen mcGvpD-Bereiche zu definieren. DE^{ex}-Transformanten, die die mc-*gvpDE*-Leserahmen unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors in pJAS35 exprimieren, enthalten kaum mcGvpE. Zur leichteren Analyse der Wirkung verschiedener mcGvpD-Mutanten auf die mcGvpE-Menge wurde zunächst ein weiterer Expressionsvektor durch Inserierung des *fdx*-Promotors in pWL102 hergestellt. Die mcD^{ex}+mcE^{ex}- und mcD^{ex}+cE^{ex}-Doppeltransformanten, die beide Gene von verschiedenen Vektoren aus exprimierten, zeigten ebenfalls die mcGvpD-vermittelte Reduktion der GvpE-Menge. Eine verminderte mcGvpD-Menge wie in DE^{ex}-Transformanten konnte in den mcD^{ex}+E^{ex}-Transformanten allerdings nicht beobachtet werden. Anhand der verschiedenen mcGvpD-Mutanten wurde deutlich, dass das *p-loop*-Motiv und die basische Region 1 für die mcGvpD-induzierte Reduktion der GvpE-Menge wichtig sind. Der reduzierende Effekt von mcGvpD findet nicht auf der Transkriptebene, sondern auf der Proteinebene statt. Alle mcGvpD-Mutanten, die die GvpE-Menge nicht reduzieren können, haben auch die Fähigkeit zur Repression der Gasvesikelbildung verloren, so dass die repressorische Wirkung des mcGvpD-Proteins offensichtlich in der Induktion der Degradation des Transkriptionsaktivators GvpE besteht.

Ähnlich wie für mcGvpD wurden auch verschiedene cGvpE-Mutanten mit Substitutionen von konservierten Aspartatresten in mcD^{ex}+cE_{Mut}^{ex}-Transformanten auf ihre Stabilität hin untersucht. Keine der analysierten cGvpE-Mutanten war in Gegenwart des mcGvpD-Proteins stabil, wodurch eine Rolle dieser Aspartatreste als mögliche Modifikationsstelle für eine Markierung zur Degradation ausgeschlossen werden konnte.

Erste Untersuchungen zur Quartärstruktur des mcGvpD_{his}-Proteins durch Gelfiltration, native Polyacrylamidgelelektrophorese und Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation deuteten an, dass das GvpD_{his}-Protein nicht nur in seiner monomeren Form, sondern als eine heterogene Mischung von oligomeren Komplexen mit unterschiedlichen molaren Massen vorliegt. Zusätzlich wurden auch mcGvpE_{his} und cGvpE_{his} hinsichtlich ihrer Quartärstruktur analysiert. All diese Proteine wurden jeweils sowohl in *E. coli* als auch in *Hfx. volcanii* produziert. Die in *E. coli* produzierten Proteine wurden denaturierend in 8 M Harnstoff gereinigt und durch Dialyse in 2,5 M KCl rückgefaltet. Der Vergleich der erhaltenen Ergebnisse zeigte, dass die hier untersuchten halophilen Proteine aus *E. coli* durch Dialyse nicht vollständig in ihre native Konformation überführt werden können. Bei der Reinigung von Gvp_{his}-Proteinen aus *Hfx. volcanii* wurde ein weiteres, ca. 60 kDa großes *Hfx. volcanii*-Protein als Verunreinigung erhalten, das auch allein aus *Hfx. volcanii* gereinigt und durch N-terminale Sequenzierung als PitA identifiziert wurde (Bab-Dinitz *et al.*, 2006). Dieses Protein weist eine interne Ansammlung von Histidinen auf, was seine Bindung an eine Ni-NTA-Matrix erklärt.

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

Scheuch, S. & Pfeifer, F. (2007). GvpD-induced breakdown of the transcriptional activator GvpE of halophilic archaea requires a functional p-loop and an arginine-rich region of GvpD. *Microbiology* 153: 947-958

Pfeifer, F., Hechler, T., Scheuch, S. & Sartorius-Neef, S. (2007). Transcriptional regulation in Haloarchaea. In *Archaea: Evolution, Physiology and Molecular Biology* (Eds. Garrett, R.A. & Klenk, H.-P.) Blackwell Publishing, Malden MA, USA; Chapter 17, 199-206

Pfeifer F., Zimmermann P., Scheuch S. & Sartorius-Neef S. (2005). Gene regulation and the initiation of translation in halophilic archaea. In: *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya* (Eds. Gunde-Cimerman, N., Oren, A. Plemenitaš, A.) Springer Netherlands; Section II, 201-215

2. Einleitung

Archaea stellen neben den Bakterien und Eukaryonten eine der drei Domänen der belebten Welt dar. Diese Einteilung der belebten Welt wurde durch die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums aufgrund von 16S bzw. 18S rRNA-Analysen ermöglicht (Woese & Fox, 1977; Woese, 1987; Woese *et al.*, 1990). Anhand der phylogenetischen Klassifizierung durch 16S rRNA-Analysen können heute vier Gruppen in der Domäne der Archaea unterschieden werden: Euryarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota und Nanoarchaeota (Abb. 1). Bisher kultivierte Archaea sind überwiegend Extremophile und besiedeln Habitate mit extremen abiotischen Faktoren, wie hohe Temperaturen, sehr saurem bzw. basischem pH-Wert, hohem Druck oder hohen Salzkonzentrationen. Neuere Umweltstudien zeigen jedoch, dass die Archaea ubiquitär verbreitet sind. Die in dieser Arbeit analysierten Proteine stammen aus Halobakterien, die in die Gruppe der Euryarchaeota einzuordnen sind (Abb. 1).

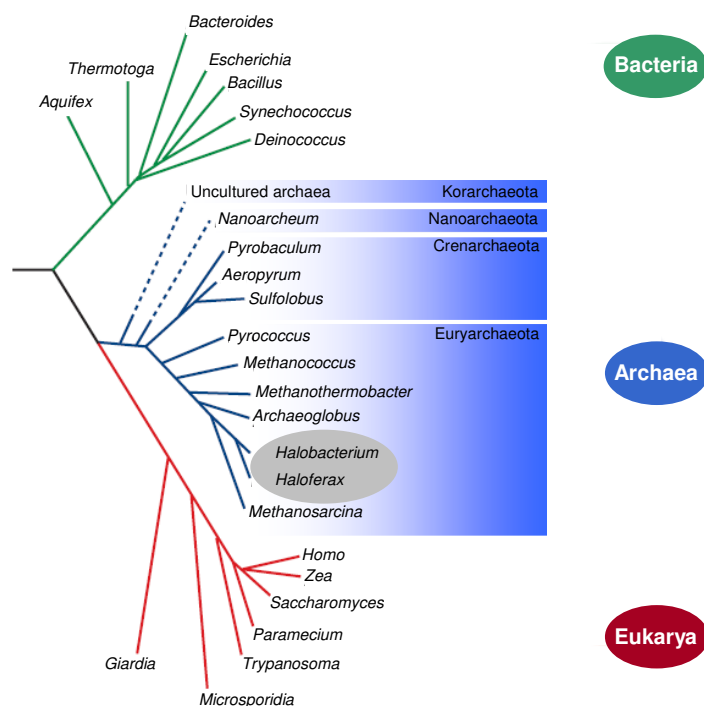


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S bzw. 18S rRNA-Sequenzvergleichen als molekulare Chronometer (aus Allers & Mevarech, 2005).

2.1 Halobakterien und halophile Anpassung

Mikrobielles Leben kann über einen breiten Salzkonzentrationsbereich von Süßwasser, marinen Biotopen bis hin zu hypersalinen Umgebungen mit Salzkonzentrationen im Sättigungsbereich gefunden werden. Halophile oder halotolerante Mikroorganismen kommen in allen drei Domänen des Lebens vor: Archaea, Bakterien und Eukaryonten (Oren, 1999).

In der Domäne der Archaea stellen die Ordnung der Halobacteriales, die nur aus der Familie der Halobacteriaceae besteht, und einige Methanogene (*Methanohalobium*, *Methanohalophilus*) halophile Organismen dar. Trotzdem werden eigentlich nur die Mitglieder der Halobacteriaceae als halophile Archaea oder auch Halobakterien bezeichnet. Halobakterien benötigen Salzkonzentrationen von mindestens 1,5 M NaCl (9%) im Außenmedium, wobei ihre optimalen Wachstumsbedingungen bei Salzkonzentrationen von 3,5 bis 4,5 M (21 bis 26%) NaCl liegen und sie sogar noch in gesättigten Lösungen mit 5,2 M NaCl (30%) wachsen (Grant & Larsen, 1989). In hypersalinen Habitaten mit Salzkonzentrationen nahe der Sättigungsgrenze werden die Halobakterien zur dominierenden Population (Rodriguez-Valera *et al.*, 1981).

Für die Familie der Halobacteriaceae wurden bisher 22 Gattungen beschrieben (Grant *et al.*, 2001; NCBI-Datenbank) und sie kann physiologisch in zwei Gruppen unterteilt werden. Mitglieder der ersten Gruppe (z. B. *Halobacterium*, *Haloferax*, *Halococcus*, *Haloarcula*, *Halobaculum*) wachsen bei einem pH-Optimum von 5 bis 8 und benötigen mindestens 5 mM Mg^{2+} . Wohingegen Mitglieder der zweiten Gruppe (z. B. *Halorubrum*, *Natrialba*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*) optimal bei pH-Werten von 8,5 bis 11 und niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen (< 1 mM) wachsen (Grant & Larsen, 1989; Kameruka, 1998).

Biologische Membranen sind wasserdurchlässig, das Wasserpotential des Cytoplasmas einer Zelle darf folglich nicht höher als das des umgebenden Salzwassers sein, da dies zu einem schnellen Verlust von Wasser an die Umgebung führen würde (Brown, 1990). Mikroorganismen, die in Habitaten mit hohen Salzkonzentrationen leben, müssen deshalb ihr Cytoplasma zumindest isoosmotisch mit der extrazellulären Umgebung halten (Oren, 1999). Es existieren zwei grundlegend verschiedene Anpassungsstrategien für Mikroorganismen mit dem osmotischen Stress bedingt durch ein hypersalines Habitat zu Recht zu kommen: Die *compatible solutes*- oder die *salt-in*-Strategie.

Bei der *compatible solutes*-Strategie akkumulieren die Zellen kleine organische Moleküle (z. B. Glycin, Ektin) im Zellinneren, um den durch das Außenmedium bedingten osmotischen Druck auszugleichen (*compatible solutes*-Strategie). In diesem Fall bleibt die Salzkonzentration im Cytoplasma gering und eine Anpassung des intrazellulären Systems ist nicht erforderlich (Oren, 1999), da *compatible solutes* auch bei hohen intrazellulären Konzentrationen die Funktionalität der Enzyme nicht beeinträchtigen (Brown, 1990). Für die Synthese von 1 Mol eines *compatible solutes* zum Ausgleich von 1 Mol NaCl im Außenmedium werden zwischen 23 bis 109 Mol ATP benötigt (Dennis & Shimmin, 1997).

Eine andere Möglichkeit ein osmotisches Gleichgewicht zwischen dem Außenmedium und dem Zellinneren herzustellen, ist die Akkumulation von hohen intrazellulären Salzkonzentrationen, die als *salt-in*-Strategie bezeichnet wird. Diese Strategie ist energetisch günstiger, da hier pro Mol KCl, das in der Zelle akkumuliert wird, nur 0,5 bis 0,67 Mol ATP

benötigt werden (Dennis & Shimmin, 1997). Hohe intrazelluläre Salzkonzentrationen erfordern die Anpassung aller Enzyme und struktureller Zellkomponenten, um ihre Funktionalität zu gewährleisten (Oren, 1999). Die *salt-in*-Strategie wird von zwei phylogenetisch nicht verwandten Gruppen verwendet: den aeroben extrem halophilen Archaea der Ordnung Halobacteriales (Bayley *et al.*, 1978; Kushner, 1985; Lanyi, 1974) und den anaeroben halophilen Bakterien der Ordnung Haloanaerobiales (Oren, 1986; Oren, 1992; Oren, 1993; Oren *et al.*, 1997; Pusheva *et al.*, 1996). Abweichend vom Außenmedium, das vorherrschend NaCl enthält, wird bei der *salt-in*-Strategie überwiegend KCl im Zellinneren angereichert (Dennis & Shimmin, 1997). Die primäre Energiequelle um Na^+ aus der Zelle auszuschleusen und K^+ in der Zelle zu akkumulieren, wird bei den meisten Mikroorganismen durch den elektrochemischen Protonengradient über der Cytoplasmamembran zu Verfügung gestellt (Oren, 1999). Eine Akkumulation von K^+ im Zellinneren an Stelle von Na^+ wird wahrscheinlich aufgrund eines wesentlichen Vorteils bevorzugt: Na^+ -Ionen sind kleiner als K^+ -Ionen. Je kleiner ein Ion ist, desto konzentrierter ist seine Ladung und desto stärker ist das umgebende elektrische Feld. Infolgedessen werden umgebende Wassermoleküle stärker angezogen. Na^+ -Ionen besitzen somit eine größere Hydrathülle und binden mehr Wasser als K^+ -Ionen. Durch die Akkumulation von K^+ -Ionen steht somit mehr freies Wasser für intrazelluläre Prozesse und die Hydratation von Proteinen zur Verfügung.

2.2 Halophile Proteine

Hohe Salzkonzentrationen beeinflussen die Stabilität der Proteinkonformation und im Allgemeinen destabilisieren Salzbedingungen, die die Löslichkeit von Proteinen begünstigen deren Proteinfaltung und umgekehrt (von Hippel & Schleich, 1969). Halophile Proteine haben deshalb spezielle Mechanismen entwickelt, die es ihnen bei hohen cytoplasmatischen KCl-Konzentrationen ermöglichen sowohl löslich als auch stabil in ihrer nativen Konformation vorzuliegen (Madern *et al.*, 2000).

Halophile Proteine besitzen einen größeren Anteil von sauren Aminosäureresten als ihre nicht-halophilen Homologe (Lanyi, 1974). Strukturelle Analysen zeigen, dass die Aminosäuren mit sauren Seitenketten in halophilen Archaea überwiegend auf der Oberfläche von halophilen Enzymen lokalisiert sind (Dym *et al.*, 1995; Frolow *et al.*, 1996; Pieper *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 2002; Bieger *et al.*, 2003). Saure Seitenketten von Aminosäuren sind stärker hydriert als andere Aminosäuren und können deshalb die Ausbildung eines hydrierten Salz-Ionen-Netzwerkes koordinieren (Eisenberg *et al.*, 1992; Zaccai *et al.*, 1989; Dym *et al.*, 1995; Frolow *et al.*, 1996). Weiterhin besteht die Vermutung, dass nicht nur die Erhöhung des Aminosäureanteils mit sauren Seitenketten, sondern auch deren präzise strukturelle Anordnung als lokale Gruppe wichtig ist, um ein hydratisiertes Ionennetzwerk zu

binden (Madern *et al.*, 1995; Jolley *et al.*, 1997; Pieper *et al.*, 1998; Richard *et al.*, 2000). Das vermehrte Vorkommen von Aminosäuren mit sauren Seitenketten und anderen hydrophilen Seitenketten kann die Proteinhydrophobizität reduzieren und so helfen, einen strukturellen Zusammenbruch und Aggregieren (*salt out*) zu verhindern (Eisenberg, 1992; Lanyi, 1974; Zaccai *et al.*, 1989). Außerdem können Aminosäuren mit sauren Seitenketten Salzbrücken mit basischen Aminosäureseitenketten (Lysin und Arginin) ausbilden (Dym *et al.*, 1995). Salzbrücken, die durch ihre Position vor einem Kontakt mit den Ionen des Lösungsmittels geschützt sind, tragen zur strukturellen Starrheit bei und sind so wichtige Determinanten bei der Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur von halophilen Proteinen (Dym *et al.*, 1995). Weiterhin besitzen halophile Proteine einen signifikant geringeren Anteil von Lysin, einen erhöhten Anteil von kleinen hydrophoben Aminosäureresten (Alanin, Valin) (Madern *et al.*, 1995) und eine Verringerung von stark hydrophoben Aminosäuren (Phenylalanin, Isoleucin, Valin und Leucin) (Lanyi, 1974). Ein weiterer beobachteter Unterschied zwischen halophilen Proteinen und ihren nicht-halophilen Gegenstücken ist ein erhöhter Anteil von Aminosäuren mit aliphatischen Hydroxylgruppen (Serin und Threonin) (Lanyi, 1974). Die Reduktion des Anteils von Lysin in halophilen Proteinen führt zu einer signifikanten Reduktion des hydrophoben Charakters der Proteinoberfläche (Madern *et al.*, 1995; Britton *et al.*, 1998). Somit resultiert der saure Charakter der halophilen Primärproteinstruktur sowohl von einer Reduktion des Lysinanteils als auch einer Erhöhung von Aspartat- und Glutaminsäurereste im Vergleich zu den nicht-halophilen Homologen (Madern *et al.*, 1995). Der reduzierte Anteil hydrophober Aminosäuren, sollte in einer schwachen Packung des hydrophoben Proteinskerns resultieren. Diese unzureichende Packung macht Salze für die Faltung, Stabilität und Funktionalität von halophilen Enzymen notwendig (Arakawa & Tokunaga, 2004).

Faltungs- und Stabilisierungsprozesse eines Proteins können nicht nur auf intramolekulare Wechselwirkungen des Proteins bzw. intermolekulare Wechselwirkungen der Untereinheiten zurückgeführt werden, sondern müssen auch im Kontext der Interaktion des Proteins mit dem Lösungsmittel betrachtet und erklärt werden (Dill, 1990). Bisher existieren nur wenige strukturelle Daten mit einer Auflösung, die auch die Analyse der Interaktion des Proteins mit dem Lösungsmittel zulässt. Das Verständnis der molekularen Adaptation halophiler Proteine an die Hochsalzbedingungen wird durch Schwierigkeiten der Kristallisation halophiler Proteine behindert. Hohe Salzkonzentrationen sind häufig nicht dazu in der Lage das gewünschte Protein auszufällen, sondern werden benötigt um seine native Konformation beizubehalten. Weiterhin sind sie Hochsalzbedingungen häufig unvereinbar mit den konventionellen Kristallisationsbedingungen. Die bisher erzielten Ergebnisse geben interessante Einblicke über strukturelle Eigenschaften halophiler Proteine und ihre

Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel. So konnten folgende Merkmale beobachtet, die wahrscheinlich zur molekularen Adaptation halophiler Proteine beitragen:

Die Ausbildung von Salzbrücken-Netzwerken an den Kontaktflächen der Untereinheiten oligomerer Proteine, bei denen Arginin mit mehr als einem sauren Aminosäurerest interagiert (Dym *et al.*, 1995; Bieger *et al.*, 2003). Diese Salzbrücken-Netzwerke sind für das Lösungsmittel zugänglich und würden somit durch die hohen Salzkonzentrationen destabilisiert. Die spezifische Bindung von Natrium- und Chloridionen an die Salzionen-Netzwerke stellt wahrscheinlich einen Mechanismus zur Stabilisierung bei hohen Salzkonzentrationen dar (Bieger *et al.*, 2003). Die Ausbildung von Salzbrücken-Netzwerken zwischen den Untereinheiten kann auch in hyperthermophilen Proteinen im Vergleich zu mesophilen Proteinen beobachtet werden (Hennig *et al.*, 1995; Aguilar *et al.*, 1997; Villeret *et al.*, 1998).

Die Lokalisierung von Aminosäuren mit sauren Seitenketten am N-Terminus von α -Helices und eine Erhöhung ihres Alanin-Gehalts tragen zur Stabilisierung der Helix bei. Diese Eigenschaft könnte sowohl bei der halophilen als auch bei der thermophilen Anpassung eine Rolle spielen (Nicholls *et al.*, 1991; Nicholson *et al.*, 1991; Dym *et al.*, 1995).

Eine N-terminale Verlängerung der Aminosäuresequenz verglichen mit anderen homologen Proteinen, die aus Aminosäuren mit negativ geladenen Seitenketten besteht, deren Carboxylatgruppen möglicherweise die zur Solvatisierung zur Verfügung stehende Oberfläche vergrößern (Frolov *et al.*, 1996).

Die Bindung vieler Wassermoleküle, die mehr Wasserstoffbrücken ausbilden als Wassermoleküle in Kristallstrukturen nicht-halophiler Proteine (Frolov *et al.*, 1996; Richard *et al.*, 2000). Das Ausmaß und die Anordnung der Hydratisierungshülle bei halophilen Proteinen ist somit signifikant größer als bei nicht-halophilen Proteinen (Britton *et al.*, 2006).

Bei den bisherigen strukturellen Analysen konnten nur wenige, an das halophile Protein gebundene Gegenionen nachgewiesen werden (Richard *et al.*, 2000; Britton *et al.*, 2006). Diese waren zudem meist nicht mit den Carboxylatgruppen der negativ geladenen Aminosäureseitenketten, sondern mit den Carbonyl-Sauerstoffatomen des Proteinrückgrates assoziiert. Diese Ergebnisse widersprechen einer bereits lange bestehenden Vermutung, dass die Rolle der hohen Salzkonzentrationen darin besteht, die negative Oberflächenladung des Proteins abzuschirmen. Dieser Vermutung widerspricht weiterhin die Tatsache, dass die Inaktivierung einiger halophiler Proteine bei niedrigen Salzkonzentrationen durch die Bindung ihres Substrates oder eines Cofaktors verhindert werden kann (Pundak & Eisenberg, 1981; Mevarech *et al.*, 2000).

Das existierende „halophile Stabilisierungsmodell“ nach Zacchai *et al.* (1989) für NaCl, KCl und MgCl₂-Lösungen soll hier kurz dargelegt werden: Nach diesem Modell koordiniert die

Tertiär- oder Quartärstruktur eines halophilen Proteins durch spezifische Interaktionen der Carboxylatgruppen hydrierte Salzionen-Netzwerke auf ihrer Oberfläche. Die lokale Salzkonzentration in diesen Salzionen-Netzwerken ist höher als die der umgebenden Lösung. Wenn die Salzkonzentration im Lösungsmittel reduziert wird, diffundieren Salzionen aus dem Wasser-Salzionen-Netzwerk der Proteinoberfläche in die Umgebung, destabilisieren die Proteinoberfläche, was zu einer Dissoziation in die Untereinheiten und einer Entfaltung des Proteins führt.

Aufgrund der neuen strukturellen Daten schlagen Mevarech *et al.* (2000) eine modifizierte Erklärung als Grund für die halophile Adaptation vor. Alle halophilen Proteine sind stark negativ geladen. Diese Ladungen haben zwei Funktionen: (1) Sie liefern hydrierte Carboxylatgruppen, die die Löslichkeit des Proteins bei hohen Salzkonzentrationen erhalten. (2) Ihre destabilisierende elektrostatische Abstoßung gleicht die Stabilisierung des verstärkten hydrophoben Effekts durch die hohen Salzkonzentrationen wieder aus. Der Bedarf von hohen NaCl- oder KCl-Konzentrationen für die Stabilisierung von halophilen Proteinen (z. B. Malatdehydrogenase aus *Haloarcula marismortui*) kann durch eine spezifische, aber wenig affine Bindung weniger Ionen an das gefaltete Protein erklärt werden.

Halophile Proteine sind nicht nur an hohe Salzkonzentrationen angepasst, sondern sie benötigen hohe Salzkonzentrationen für ihre Stabilität und Funktion (Lanyi, 1974; Eisenberg & Wachtel, 1987; Oren, 1999). Die meisten halophilen Proteine benötigen eine Salzkonzentration von 1-2 M für ihre Stabilität und Funktionalität (Kushner, 1978; Lanyi, 1974; Jaenicke, 1981; Kushner, 1985). Die minimale Salzkonzentration, bei der ein halophiles Protein noch stabil und funktional vorliegt, kann jedoch nicht universell angegeben werden. So konnte beispielsweise für das Ferredoxin aus *Haloarcula marismortui* gezeigt werden, dass es sich um ein moderat halophiles Protein handelt, dass bis zu einer Salzkonzentration von 0,4 M stabil und funktionell vorliegt. Ein weiteres moderat halophiles Protein stellt die Dihydrofulatreduktase aus *Hbt. salinarum* dar. Sie ist stabil und funktionell bei Salzkonzentrationen bis zu 0,5 M (Boehm & Jaenicke, 1994). Die für die Funktionalität eines Proteins benötigte Salzkonzentration kann auch durch die Bindung des Substrates oder eines Cofaktors verringert werden (Pundak & Eisenberg, 1981; Mevarech *et al.*, 2000).

Die rekombinante Produktion halophiler Proteine in *E. coli* führt zu einer inaktiven Form der Proteine (Blecher *et al.*, 1993; Cendrin *et al.*, 1993). Durch denaturierende Isolierung aus *E. coli* in 8 M Harnstoff wird sichergestellt, dass die Proteine zunächst komplett entfaltet werden, bevor sie durch Überführung in Lösungen mit 1-2 M Salz in ihre native Konformation rückgefaltet werden (Soppa & Link, 1997). Für das TBP-Protein aus *Hbt. salinarum* und für die Glucose-Dehydrogenase aus *Hfx. mediterranei* konnte gezeigt werden, dass diese nach einer heterologen Produktion, denaturierenden Reinigung und anschließender Überführung

in Puffer mit einer Salzkonzentration von ≥ 2 M NaCl in ihrer funktionellen Form vorliegen (Soppa & Link, 1997; Pire *et al.*, 2001). Die native Konformation der Glucose-Dehydrogenase konnte anhand ihrer enzymatischen Aktivität gezeigt werden (Pire *et al.*, 2001, während die Rückfaltung des TBP-Proteins mittels CD-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte (Soppa & Link, 1997).

2.3 Gasvesikel und Gasvesikel-kodierende Genregion bei Halobakterien

Gasvesikel sind eine besondere Art von subzellulären Strukturen, die fast ausschließlich von aquatisch lebenden Mikroorganismen gebildet werden (Walsby, 1994). Gasvesikel konnten in über 150 Spezies von Prokaryonten gefunden werden (Walsby, 1981 a, b), worunter sich viele Arten von Cyanobakterien (Walsby, 1981a), aber auch methanogene Archaea (Archer & King, 1984) und halophile Archaea (Larsen *et al.*, 1967) befinden. Unter den halophilen Archaea sind *Hbt. salinarum*, *Hfx. mediterranei*, *Halorubrum vacuolata* und *Haloquadratum walsbyi* (früher *Natronobacterium vacuolatum*) zur Gasvesikelbildung befähigt (Stoeckenius & Kunau, 1968; Englert *et al.*, 1990; Mwatha & Grant, 1993; Pfeifer *et al.*, 1997).

Gasvesikel sind gasgefüllte Hohlkörper, die nur aus Proteinen aufgebaut und im Cytoplasma lokalisiert sind. Sie verleihen der Zelle Auftrieb und ermöglichen es, in einem wässrigen Lebensraum zur Oberfläche zu gelangen, wo höhere Sauerstoffkonzentrationen und mehr Licht vorhanden ist (Walsby, 1994). Außerdem besitzen Gasvesikel stark lichtbrechende Eigenschaften und schützen die Zellen wahrscheinlich vor photooxdativen Schäden (Shear & Walsby, 1975). Die Bildung von Gasvesikeln führt weiterhin zu einer Reduktion des Verhältnisses von cytoplasmatischem Volumen zur Zelloberfläche und somit zu einer Verkürzung der Diffusionszeiten in der Zelle (Staley *et al.*, 1989). Die stark lichtbrechenden Eigenschaften der Gasvesikel lassen Gasvesikel-bildende Stämme der Halobakterien (Vac-positiv) als opaque, hellrosa Kolonien auf Festmedien erscheinen. Halobakterien ohne Gasvesikel (Vac-negativ) bilden dagegen rote, transparente Kulturen aus. In allen untersuchten Mikroorganismen haben die Gasvesikel eine ähnliche Form und werden von einem homologen Protein aufgebaut, sie unterscheiden sich allerdings in ihrer Größe (Walsby, 1994).

Die Gasvesikelhülle ist nur aus Proteinen aufgebaut und frei von Kohlehydraten oder Lipiden (Krantz & Ballou, 1973). Sie ist wasserundurchlässig, jedoch frei permeabel für Gase, wobei keine selektive Anreicherung bestimmter Gase stattfindet (Walsby, 1969; Walsby & Hayes, 1989). Zu 95% ist die Gasvesikelhülle aus dem hydrophoben 7-8 kDa GvpA-Protein aufgebaut, welches durch eine polymere helikale Aufwindung eine Rippenstruktur ausbildet (Walsby, 1994; Offner *et al.*, 1998). Innerhalb der Gasvesikel-produzierenden Halobakterien ist die Aminosäuresequenz des GvpA-Proteins stark konserviert, was sich in einer Sequenzähnlichkeit von 94% äußert (Englert *et al.*, 1990; Englert *et al.*, 1992a). Eine weitere

strukturelle Komponente der Gasvesikelhülle ist das hydrophile 20-42 kDa GvpC-Protein, (Walsby & Hayes, 1988; Hayes *et al.*, 1988; Englert & Pfeifer, 1993; Halladay *et al.*, 1993), das bei Cyanobakterien zu Stabilisierung der gesamten Struktur beiträgt (Hayes *et al.*, 1992; Kinsman *et al.*, 1995) und bei Halobakterien auch an der Formgebung beteiligt ist (Englert & Pfeifer, 1993; Offner *et al.*, 1996; Best, 2000).

Insgesamt 14 verschiedene Gene sind an der Gasvesikelbildung in halophilen Archaea beteiligt. Sie werden als *gvp*-Gene (*gas vesicle protein genes*) bezeichnet, sind in einer ca. 9 kb großen *vac*-Region (*gas vacuole coding region*) lokalisiert und in zwei entgegengesetzt orientierten Gengruppen *gvpACNO* und *gvpDEFGHIJKLM* angeordnet (Horne *et al.*, 1988; Horne *et al.*, 1991; Englert *et al.*, 1992a). *Hbt. salinarum* PHH1 enthält zwei *vac*-Regionen: Eine chromosomal kodierte *c-vac*-Region, die nur teilweise exprimiert wird, und eine *p-vac*-Region auf dem 150 kb großen Plasmid pHH1, deren konstitutive Expression zur Bildung spindelförmiger Gasvesikel in allen Wachstumsphasen führt (Horne & Pfeifer, 1989). *Hbt. salinarum* PHH4 fehlt die *p-vac*-Region auf dem Plasmid pHH4, hier führt die Expression der *c-vac*-Region zur Bildung zylinderförmiger Gasvesikel in der stationären Wachstumsphase (Horne *et al.*, 1988; Pfeifer & Blaseio, 1989; Horne *et al.*, 1991; Englert *et al.*, 1992a). In *Hfx. mediterranei* erfolgt die Gasvesikelbildung ausgehend von der chromosomal kodierten *mc-vac*-Region (*Hfx. mediterranei chromosomal*) (Englert *et al.*, 1992a). Die Bildung von zylinderförmigen Gasvesikeln in der stationären Wachstumsphase in *Hfx. mediterranei* findet jedoch nur statt, wenn die Salzkonzentration im Medium mindestens 17% beträgt (Rodriguez-Valera *et al.*, 1983; Englert *et al.*, 1990). Da die Gasvesikelsynthese durch verschiedene Faktoren wie Licht, Sauerstoff, Salzkonzentration und Wachstumsphase des Organismus beeinflusst wird (Pfeifer *et al.*, 1997), stellt die Expression der *gvp*-Gene ein interessantes Modell zur Untersuchung der Genregulation in Archaea dar.

Die Untersuchung der Funktion der einzelnen *gvp*-Gene wurde durch die Entwicklung eines Transformationssystems für halophile Archaea erleichtert (Cline & Doolittle, 1987; Cline *et al.*, 1989; Blaseio & Pfeifer, 1990). Als Rezipient für die Transformationsstudien eignet sich *Hfx. volcanii* WFD11, der selbst keine Gasvesikel-kodierende Region besitzt. Für die Analysen stehen mehrere Plasmidvektoren zur Verfügung, die sowohl in *E. coli* als auch in *Hfx. volcanii* repliziert werden können (Lam & Doolittle, 1989; Holmes *et al.*, 1991; Pfeifer *et al.*, 1994). Mit Hilfe des Expressionsvektors pJAS35 können Gene ohne eigenen Promotor unter der Kontrolle des Ferredoxin-Promotors (*fdx*-Promotor) aus *Hbt. salinarum* exprimiert werden (Pfeifer *et al.*, 1994). Der Vektor pWL102 (Lam & Doolittle, 1989) dagegen dient zur Expression der *gvp*-Gene unter ihrer natürlichen Promotorkontrolle. Für die Analyse halobakterieller Promotoren kann das *bgaH*-Gen aus *Hfx. lucentense* als Reportergensystem

verwendet werden, das für ein halobakterielles Enzym mit β -Galaktosidaseaktivität kodiert (Holmes & Dyall-Smith, 2000; Patenge *et al.*, 2000; Gregor & Pfeifer, 2001).

Die Transkription der c-vac- und mc-vac-Region erfolgt ausgehend von zwei Promotoren, die vor den Genen *gvpA* und *gvpD* lokalisiert sind (Abb. 2). Die p-vac-Region enthält dagegen zwei zusätzliche Promotoren vor den Genen *gvpF* und *gvpO* (Horne & Pfeifer, 1989; Englert *et al.*, 1992a; Offner & Pfeifer, 1995; Krüger & Pfeifer, 1996; Offner *et al.*, 1996).

Hfx. mediterranei, mc-vac-Region

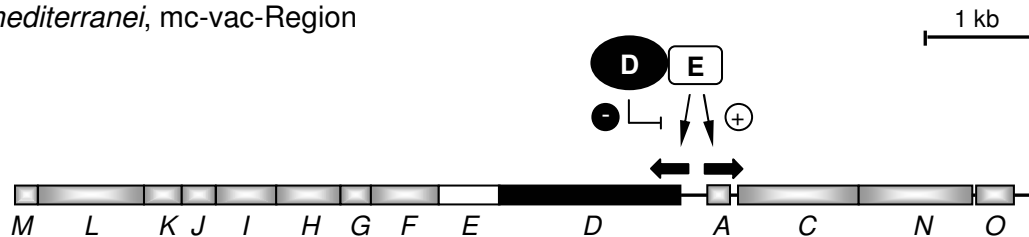


Abb. 2: Gasvesikel-kodierende Region von *Hfx. mediterranei* (mc-vac). Die 14 *gvp*-Gene sind als Kästchen dargestellt und mit Großbuchstaben bezeichnet. Die dicken Pfeile geben den Start und die Richtung der Transkription an. Die beiden regulatorischen Proteine GvpE (Aktivator) und GvpD (beteiligt an der Repression der Gasvesikelbildung) sind schematisch dargestellt.

Der P_{mcA} -Promotor ist während der exponentiellen Wachstumsphase von *Hfx. mediterranei* nahezu inaktiv, während in der stationären Wachstumsphase große Mengen des mc-*gvpA*-Transkriptes gebildet werden (Röder & Pfeifer, 1996; Zimmermann & Pfeifer, 2003). Eine ähnliche wachstumsphasenabhängige Regulation der P_{mcA} -Promotoraktivität kann auch in Transformanten von *Hfx. volcanii* (nahe verwandt zu *Hfx. mediterranei*) beobachtet werden, die die komplette mc-vac-Region enthalten (Englert *et al.*, 1992b; Zimmermann & Pfeifer, 2003). *Hfx. volcanii*-Transformanten, die dagegen nur den P_{mcA} -Promotor und das mc-*gvpA*-Gen enthalten, bilden während der gesamten Wachstumsphase nur geringe Mengen des mc-*gvpA*-Transkriptes. Enthalten diese Transformanten zusätzlich den mc-*gvpE*-Leserahmen unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors in pJAS35, werden sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase große Mengen des mc-*gvpA*-Transkriptes gebildet, was zeigt, dass GvpE den P_{mcA} -Promotor allein aktivieren kann (Röder & Pfeifer, 1996; Zimmermann & Pfeifer, 2003). Unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors wird der mc-*gvpE*-Leserahmen schon während der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert, was hier zur frühen Aktivierung des P_{mcA} -Promotors führt. In *Hfx. mediterranei* dagegen kann das mcGvpE-Protein erst während der spät-exponentiellen und stationären Wachstumsphase nachgewiesen werden (Zimmermann & Pfeifer, 2003).

Untersuchungen mit Subfragmenten der mc-vac-Region machten weiterhin die repressorische Funktion von mcGvpD deutlich, wobei möglicherweise weitere Genprodukte der mc-vac-Region an der Repression beteiligt sind, deren Fehlen durch große Mengen des

mcGvpD-Proteins ausgeglichen werden kann (Pfeifer *et al.*, 2001). So weisen ADE-Transformanten (ADE-Konstrukt: mc-*gvpA*- und mc-*gvpDE*-Gene in ihrer nativen Anordnung unter Kontrolle der endogenen Promotoren) im Vergleich zu A Δ DE-Transformanten (A Δ DE-Konstrukt: Variante von ADE mit einer internen 981 bp Deletion im mc-*gvpD*-Gen) nur eine leichte Reduktion der mc-*gvpA*-Transkriptmenge auf, die wesentlich geringer als in mc-vac-Transformanten ist. In A Δ DE+D^{ex}-Transformanten ist die mc-*gvpA*-Transkriptmenge dagegen stark reduziert war (Pfeifer *et al.*, 2001).

Es sind also mindestens zwei der durch die vac-Regionen kodierten Proteine an der Regulation der Gasvesikelbildung beteiligt (Abb. 2). GvpE ist ein Transkriptionsaktivator, der die P_A -Promotoren aller vac-Regionen sowie den entgegengesetzt orientierten P_D -Promotor der p-vac und mc-vac-Region aktiviert, wohingegen der P_{cD} -Promotor auf geringem Niveau konstitutiv aktiv ist (Röder & Pfeifer, 1996; Krüger *et al.*, 1998; Gregor & Pfeifer, 2001; Zimmermann & Pfeifer, 2003; Hofacker *et al.*, 2004). Das GvpD-Protein ist dagegen an der Repression der Gasvesikelbildung beteiligt (Englert *et al.*, 1992b; Röder & Pfeifer, 1996; Pfeifer *et al.*, 1994; Pfeifer *et al.*, 2001; Zimmermann & Pfeifer, 2003).

2.4 Transkription und Transkriptionsregulatoren in Archaea

Der Prozess der archaealen Transkription stellt ein interessantes Mosaik aus eukaryotischen und bakteriellen Eigenschaften dar. Eukaryotische Merkmale werden hauptsächlich im basalen Transkriptionsapparat und der Promotorstruktur gefunden, wohingegen die meisten bisher charakterisierten Transkriptionsregulatoren denen der Bakterien ähnlich sind.

Die archaeale DNA-abhängige RNA-Polymerase (RNAP) besteht aus 10 bis 14 Untereinheiten, die homolog zu den entsprechenden Untereinheiten der eukaryotischen RNAP II sind (Zillig *et al.*, 1979; Langner *et al.*, 1995).). Im Gegensatz dazu besteht die bakterielle RNAP nur aus 4 Untereinheiten ($\alpha_2\beta\beta'$), deren Spezifität für bestimmte Promotoren durch die Assoziation mit verschiedenen σ -Faktoren bedingt wird. Die Transkription der Archaea wird von einer einzigen RNAP katalysiert, wohingegen Eukaryonten drei verschiedene RNAP's für die Transkription der Protein-kodierenden Gene, der rRNA- und tRNA-Gene besitzen. Die meisten archaealen Promotor besitzen eine Eukaryonten-ähnliche TATA-Box ca. 25 nt stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle (Reiter *et al.*, 1990; Hain *et al.*, 1996; Thomm, 1996) und ein BR-Element (*transcription factor B recognition element*), das sich unmittelbar stromaufwärts der TATA-Box befindet und wichtig für die Promotorstärke als auch für die Orientierung des Transkriptionsinitiationskomplexes ist (Lagrange *et al.*, 1998; Qureshi & Jackson, 1998; Soppa, 1999; Bell *et al.*, 1999a).

Für die Initiation der Transkription in Archaea werden neben der RNAP auch Initiationsfaktoren benötigt (Hausner & Thomm, 1993; Qureshi *et al.*, 1997). Hierbei handelt

es sich um das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) und den Transkriptionsfaktor B (TFB), die homolog zu den eukaryotischen Faktoren TBP und TFIIB sind. Zusammen mit der RNAP reichen die beiden Faktoren TBP und TFB aus, um die archaeale Transkription zu initiieren (Hethke *et al.*, 1996; Hausner *et al.*, 1996; Bell *et al.*, 1998).

Anhand der steigenden Anzahl sequenzierter archaealer Genome wurde offensichtlich, dass die meisten Archaea nur ein *tbp*- und ein *tfb*-Gen besitzen. In Halobakterien scheint dagegen der Besitz von mehreren *tbp*- und *tfb*-Genen die Regel zu sein. So besitzt *Hbt. salinarum* sp. NRC-1 sechs *tbp*-Gene und sieben *tfb*-Gene (Ng *et al.*, 2000). *Haloarcula marismortui* enthält dagegen in seinem Genom ein *tbp*-Gen und acht verschiedene *tfb*-Gene (Baliga *et al.*, 2004). Die Vielfalt dieser Faktoren führte zu der Hypothese, dass sie durch Bildung verschiedener TBP-TFB-Komplexe eine Rolle bei der Transkriptionsregulation spielen (Baliga *et al.*, 2000).

Archaeale Chromosome ähneln den bakteriellen Genomen in der Größe und der Organisation als zirkuläre DNA-Moleküle. Die archaeale DNA wird zur Kompaktierung in Nukleosomen-ähnliche Strukturen gebündelt (Pereira *et al.*, 1997). Zwei Familien von archaealen Chromatinprotein-Familien, Histone und Alba, sind in Archaea weit verbreitet und stellen den konservierten Kern des archaealen Chromatins dar (Sandman & Reeve, 2005). Es konnten aber auch verschiedene weitere archaeale Chromatinprotein-Familien identifiziert werden (z.B. Hta, MC1 and Sul7) (DeLange *et al.*, 1981; Reddy & Suryanarayana, 1989; Chartier *et al.*, 1989) deren phylogenetische Verbreitung allerdings stärker limitiert ist. Ob eine Chromatin-Remodellierung oder Histon-Modifikation an der Kontrolle der Genexpression in Archaea beteiligt ist, ist bisher allerdings noch nicht bekannt (Coulson *et al.*, 2006).

Archaeale Gene sind wie die bakteriellen Gene in Operons organisiert und werden als Transkriptionseinheiten reguliert. Eine detaillierte Analyse von putativen DNA-bindenden Domänen in den archaealen Genomen wies auf eine große Anzahl von Proteinen mit *helix-turn-helix*-Motiven hin, die ein typisches DNA-Bindemotiv von bakteriellen Transkriptionsregulatoren darstellen (Pabo & Sauer, 1992; Aravind & Koonin, 1999). Alle bisher charakterisierten archaealen Transkriptionsregulatoren sind in ihrer Struktur und Funktion den bakteriellen Transkriptionsregulatoren ähnlich (Bell *et al.*, 1999a; Hochheimer *et al.*, 1999; Brinkmann *et al.*, 2000; Enora-Eta *et al.*, 2000; Leonard *et al.*, 2001).

Einige archaeale Repressoren üben ihren Einfluss auf die Transkription nach einfachen bakteriellen Regeln aus: sie binden an DNA-Stellen, die mit dem Promotor überlappen und überdecken dadurch die TATA-Box oder das BR-Element oder sie verhindern die Rekrutierung der RNAP (Ouhammouch, 2004). Zu diesen negativen archaealen Regulatoren gehören beispielsweise archaeale Paraloge des bakteriellen Regulators Lrp (*leucine responsive regulators* protein): LrpA aus *Pyrococcus furiosus* blockiert den Eintritt der RNAP

in den Promotorkomplex, wohingegen Lrs14 aus *Sulfolobus solfataricus* die Zugänglichkeit der TATA-Box oder des BRE behindert und so die Transkription inhibiert (Bell & Jackson, 2000b; Dahlke & Thomm, 2002).

Das Ptr2-Protein aus *Methanocaldococcus janaschii* ist ein Beispiel für einen positiven archaealen Transkriptionsregulator. Ptr2 gehört zur Lrp-Familie und kann TBP zum Promotor rekrutieren. Ptr2 bindet spezifisch an DNA-Sequenzen, die in einem geeigneten Abstand stromaufwärts des Promotors lokalisiert sind und erleichtert wahrscheinlich durch Protein-Protein-Interaktion die Bindung von TBP an den Promotor (Ouhammouch *et al.*, 2003, 2005).

Bisher sind nur zwei charakterisierte archaeale Transkriptionsregulatoren Eukaryonten-ähnlich: Das ORF80-Protein aus *Sulfolobus islandicus* und das GvpE-Protein aus *Hfx. mediterranei* und *Hbt. salinarum* ähneln basischen Leucizipper-Proteinen. Das ORF80-Protein aus *Sulfolobus islandicus* bindet spezifisch an eine palindromische DNA-Sequenz, bildet Dimere in Lösung aus und assembliert zu einem größeren Komplex, wenn es an DNA gebunden vorliegt (Lipps *et al.*, 2001). Verglichen mit allen anderen bekannten Leucizipper-Proteinen ist die Anordnung der Domänen vertauscht: das Leucizipper-Motiv ist N-terminal der basischen Region lokalisiert (Lipps *et al.*, 2001).

Der Leucizipper-ähnliche Transkriptionsaktivator GvpE aktiviert die Transkription der Gasvesikelgene in *Hfx. mediterranei* und *Hbt. salinarum* (Krüger & Pfeifer, 1996; Röder & Pfeifer, 1996; Krüger *et al.*, 1998; Plöber & Pfeifer, 2002) und trägt im Zusammenspiel mit dem negativen Regulator GvpD zur Regulation der Gasvesikelbildung bei. Die Eigenschaften dieser beiden regulatorischen Proteine werden im Folgenden näher beschrieben.

2.5 Der Transkriptionsaktivator GvpE

Das GvpE-Protein ist ein Transkriptionsaktivator für die P_A - und P_D -Promotoren aller vac-Regionen, mit Ausnahme von P_{cD} (Röder & Pfeifer, 1996; Krüger *et al.*, 1998; Zimmermann & Pfeifer, 2003; Hofacker *et al.*, 2004; Gregor & Pfeifer, 2005).

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der GvpE-Proteine aller drei vac-Region weisen im C-terminalen Bereich zwei charakteristische Merkmale auf, die aus basischen Leucizipper (bZIP)-Motiven in eukaryotischen Transkriptionsfaktoren bekannt sind (Hu *et al.*, 1990): Eine Ansammlung von basischen Aminosäuren mit der Sequenz $_{143}\text{KRKVYR}_{148}$ (basische Aminosäuren sind unterstrichen, Positionsangabe bezogen auf cGvpE), die eine putative DNA-Binderegion darstellen könnte und ein Leucizipper-Motiv mit der Sequenz $_{159}\text{[V/I]X}_6\text{LX}_6\text{LX}_6\text{C}_{180}$ (x = beliebige Aminosäure, Positionsangabe bezogen auf cGvpE) (Horne *et al.*, 1991; Krüger *et al.*, 1998). Der Austausch eines Leucins gegen ein Cystein in einem Leucizipper-Motiv ist ungewöhnlich, allerdings kann in eukaryotischen bZIP-Proteinen auch

ein Austausch gegen Aminosäuren mit höherer Polarität wie Threonin erfolgen (Pabo & Sauer, 1992). Molekulare Modellierungsstudien der putativen bZIP-Region (H125 bis N182) schlugen für das cGvpE-Protein eine Leucinzipperstruktur vor, bei der das Leucinzipper-Motiv eine Dimerisierung des Proteins bewirkt und die basische DNAB-Region mit der DNA wechselwirkt (Krüger *et al.*, 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass das cGvpE-Protein in Lösung Dimere ausbildet (Plöber & Pfeifer, 2002), was dieses Modell weiterhin bestätigt. Mutationen in der putativen Leucinzipper-Region führen überwiegend zu cGvpE-Mutanten, die in Lösung keine Dimere mehr ausbilden können und die Fähigkeit zur Aktivierung des P_{cA} -Promotors verloren haben (Plöber & Pfeifer, 2002). Veränderungen der basischen Aminosäuren in der DNAB-Region bedingen ebenfalls einen Verlust der Aktivierungsfähigkeit des cGvpE-Proteins (Krüger *et al.*, 1998).

Die direkte Bindung des GvpE-Proteins an die DNA konnte noch nicht gezeigt werden, allerdings konnte der Sequenzbereich, der für die GvpE-vermittelte Aktivierung der P_A - und P_D -Promotoren wichtig ist, ermittelt werden (Gregor & Pfeifer, 2005; Bauer *et al.*, eingereicht). Die beiden Promotoren P_A und P_D sind entgegengesetzt orientiert und ihre jeweiligen BR-Elemente sind in der p-vac und mc-vac-Region nur durch eine 35 Nukleotide lange Sequenz voneinander getrennt. Mit Hilfe einer *scanning*-Mutagenese dieses Bereichs der mc-vac-Region konnte die Sequenz TGAAACGG-n4-TGAACCAA in unmittelbarer Nähe des BR-Elementes als wichtig für die GvpE-vermittelte Aktivierung von P_{mcA} identifiziert werden (Gregor & Pfeifer, 2005). Ähnliche Sequenzmotive können auch in den P_{pA} - und P_{cA} -Promotoren gefunden werden, was nahe legt, dass es sich hierbei um „*upstream activator sequences*“ (UAS) handelt, die für die GvpE-vermittelte Aktivierung benötigt werden (Gregor & Pfeifer, 2005). Auch stromaufwärts der BR-Elemente der P_D -Promotoren sind ähnliche Sequenzelemente vorhanden, die wichtig für die GvpE-vermittelte Aktivierung der Promotoren sind (Bauer *et al.*, eingereicht).

Die GvpE-UAS-Elemente sind nur 2 nt von den BR-Elementen der Promotoren entfernt, wodurch sich die Frage ergibt, ob GvpE mit dem basalen Transkriptionsapparat wechselwirkt. Für die beiden Proteine cGvpE und pGvpE konnte eine Interaktion mit 5 verschiedenen TATA-Box bindenden Proteinen (TBP-A, TBP-B, TBP-C, TBP-D, TBP-E) aus *Hbt. salinarum* PHH1 nachgewiesen werden (Teufel, 2005; Teufel & Pfeifer, in Vorbereitung). Für TFB-G konnte keine Interaktion mit GvpE gezeigt werden, allerdings wurden noch nicht alle TFB's auf eine Interaktionsfähigkeit mit GvpE hin analysiert (Teufel & Pfeifer, in Vorbereitung). Diese Ergebnisse deuten an, dass die GvpE-TBP-Interaktion die Bindung der TBP's an den Promotor erleichtert und so zu einer verstärkten Rekrutierung des basalen Transkriptionsapparates an den *gvp*-Promotoren führt (Teufel & Pfeifer, in Vorbereitung).

2.6 GvpD - involviert in die Repression der Gasvesikelbildung

Die Beteiligung von GvpD an der Repression der Gasvesikelbildung konnte durch Transformationsstudien mit *Hfx. volcanii* gezeigt werden. *Hfx. volcanii*-Transformanten, die die komplette mc-vac-Region enthalten produzieren Gasvesikel (Vac⁺-Phänotyp). Enthalten die Transformanten dagegen die mc-vac-Region mit einer internen Deletion von 918 bp im mc-gvpD-Leserahmen (ΔD), führt dies zu einer starken Überproduktion von Gasvesikeln (Vac⁺⁺-Phänotyp) (Englert *et al.*, 1992b). Diese Gasvesikelüberproduktion kann durch die zusätzliche Expression des mc-gvpD-Leserahmens unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35 (D^{ex}) verhindert werden, was deutlich macht, dass GvpD an der Repression der Gasvesikelbildung beteiligt ist (Pfeifer *et al.*, 2001).

In den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der GvpD-Proteine der drei vac-Regionen (mc-vac, c-vac und p-vac) können drei interessante Sequenzmotive gefunden werden. Hierbei handelt es sich zum einen um ein *p-loop*-Motiv nahe des N-Terminus (Abb. 3) (Saraste *et al.*, 1990) mit der Sequenz L[I/V]NGAPGTGKT an Position 36 bis 46 der GvpD-Proteine (Pfeifer *et al.*, 2001). ATP- oder GTP-bindende Proteine wie RecA, Ras, G-Proteine, Elongationsfaktoren oder die Adenylatkinase enthalten *p-loop*-Motive (Saraste *et al.*, 1990). Die konservierte Aminosäuresequenz dieses Mononukleotid-bindenden Motivs lautet GxxGxGKT/S (x = beliebige Aminosäure). Der Lysinrest bindet die negativ geladenen β - und γ -Phosphatgruppen, wohingegen der Serin- oder Threoninrest an der Magnesiumbindung beteiligt ist (Deyrup *et al.*, 1998). Durch die Bindung von ATP/GTP an das *p-loop*-Motiv wird eine Abspaltung der γ -Phosphatgruppe durch das Nukleotid-Bindeprotein selbst oder durch ein zusätzliches Protein ermöglicht (Smith & Rayment, 1996; Skovgaard *et al.*, 1998).

Außerdem befinden sich in den Aminosäuresequenzen der drei GvpD-Proteine zwei Regionen mit einer Ansammlung von basischen Aminosäuren, die putative DNA-Binderegionen darstellen könnten (Horne *et al.*, 1991; Pfeifer *et al.*, 2001). Die basische Region 1 (bR1) mit der Sequenz ₂₀₁RGRTRRxLRL[D/E]KLRG₂₂₂ (x = beliebige Aminosäure, basische Aminosäuren sind unterstrichen) ist in der N-terminalen Domäne der GvpD-Proteine lokalisiert (Abb. 3). Die basische Region 2 (bR2) ₄₉₃LRRRADR₄₉₉ (basische Aminosäuren sind unterstrichen) befindet sich in der C-terminalen Domäne der GvpD-Proteine (Abb. 3).

Weiterhin enthalten die Aminosäuresequenzen der GvpD-Proteine ein putatives Walker B-Motiv ₁₃₂[I/L]AFDS₁₃₆ (Konsensussequenz von Walker B-Motiven: hhhhDE, h = hydrophobe Aminosäure) (Abb. 3). Der Aspartatrest im Walker B-Motiv, der in verschiedenen Gruppen von ATPasen gefunden wird, ist bei Mitgliedern der RecA-Superfamilie gegen eine Aminosäure mit einer Hydroxylgruppe in der Seitenkette ausgetauscht (Leipe *et al.*, 2000), was auch für die GvpD-Proteine zutrifft. Der konservierte Glutamatrest aktiviert ein

Wassermolekül für den nukleophilen Angriff der γ -Phosphatgruppe von ATP (Story & Steitz, 1992).

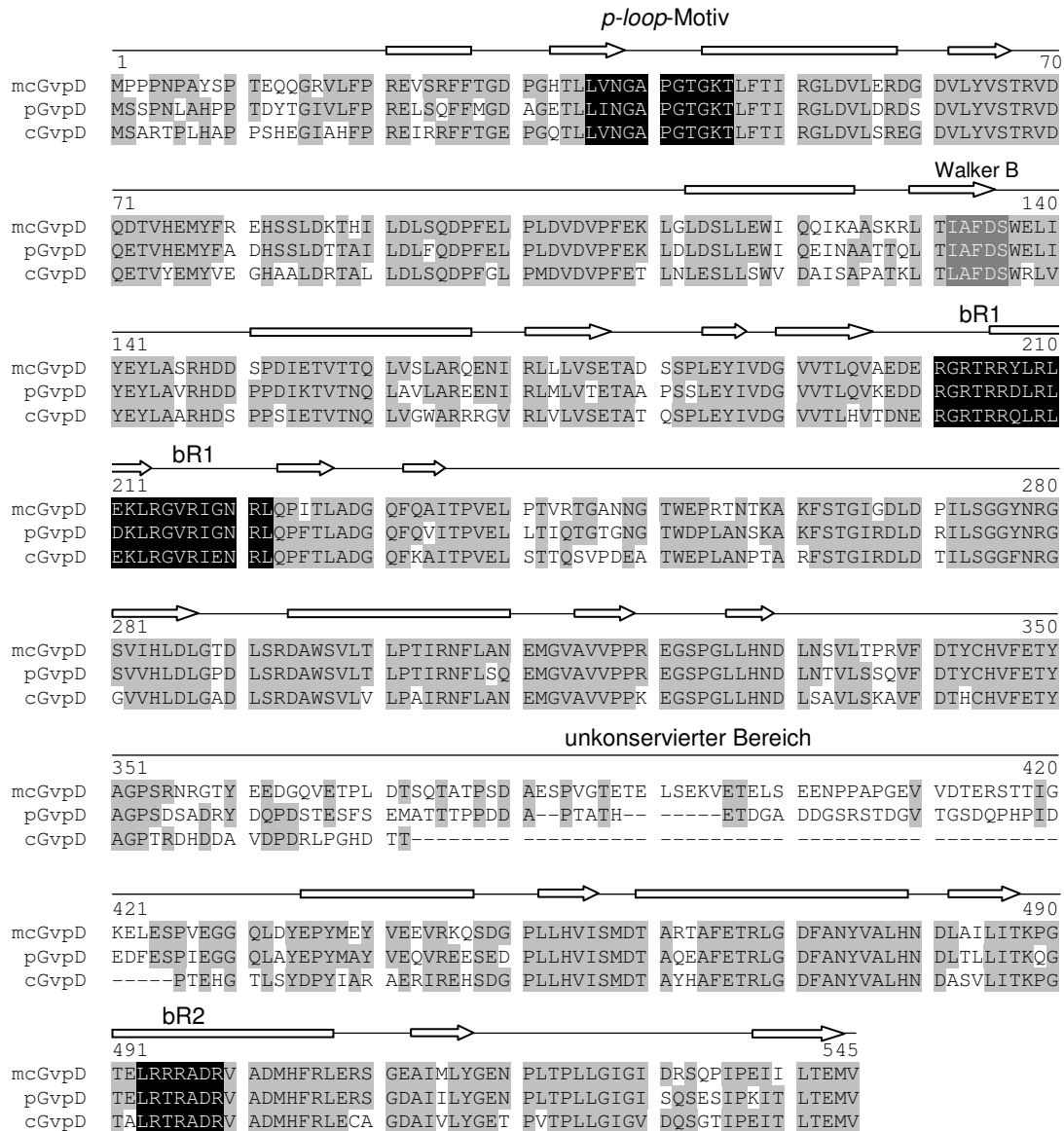


Abb. 3: Alignierung der mcGvpD-, pGvpD- und cGvpD-Aminosäuresequenzen. Die Alignierung erfolgte mit MultAlin 5.4.1 nach F. Corpet, 1988. Konservierte Aminosäuren sind hellgrau hinterlegt. Das *p-loop*-Motiv und die beiden basischen Regionen (bR1 und bR2) sind schwarz hervorgehoben. Das putative Walker B-Motiv ist dunkelgrau dargestellt. Die Sekundärstrukturvorhersage für mcGvpD mit PredictProtein (Rost *et al.*, 2004) ist über der Alignierung gezeigt (Pfeile stellen β -Faltblätter und Rechtecke α -Helices dar). Dargestellt sind nur vorhergesagte Strukturen, die Bereiche mit einem Zuverlässigkeitsindex ≥ 5 enthalten (Kapitel 7.1).

Vergleiche der Aminosäuresequenz der drei GvpD-Proteine mcGvpD, cGvpD, pGvpD zeigen, dass die N- und C-terminalen Bereiche der Proteine hochkonserviert sind und durch eine unkonservierte Region voneinander getrennt werden. Diese unkonservierte Region besteht aus 70 Aminosäuren bei mcGvpD aus *Hfx. mediterranei*, 61 Aminosäuren bei pGvpD und 17 Aminosäuren bei cGvpD aus *Hbt. salinarum* (Abb. 3) (Englert *et al.*, 1992b).

Durch Transformationsstudien mit *Hfx. volcanii* wurde bereits die Bedeutung des *p-loop*-Motivs und der beiden basischen Regionen für die repressorische Funktion des GvpD-Proteins untersucht. ΔD -Transformanten, die zusätzlich den *mc-gvpD*-Leserahmen mit Substitutionen im *p-loop*-Motiv unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors in pJAS35 enthalten, weisen einen Vac^{++} -Phänotyp auf. Alle untersuchten mcGvpD-Mutanten mit Austausch von konservierten Aminosäuren im *p-loop*-Motiv haben somit ihre repressorische Funktion verloren (Pfeifer *et al.*, 2001). Auch Substitutionen in der basischen Region 1 führen zum Funktionsverlust des mcGvpD-Proteins. Mutationen in der basischen Region 2 haben jedoch nur teilweise einen Funktionsverlust zur Folge (Pfeifer *et al.*, 2001). Der Austausch der konservierten Argininreste $_{494}RRR_{496}$ zu $_{494}ADA_{496}$ resultiert in einer mcGvpD-Mutante ohne repressorische Funktion. Die Substitution von $_{494}RRR_{496}$ zu $_{494}AAA_{496}$ führt dagegen zu einer mcGvpD-Mutante mit verstärkter repressorischer Funktion (Pfeifer *et al.*, 2001).

Durch Affinitätschromatographie konnte gezeigt werden, dass mcGvpD und mcGvpE aus *Hfx. mediterranei* *in vitro* interagieren (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Weiterhin konnte eine Bindung von ATP durch mcGvpD nachgewiesen werden (Zimmermann, 2003). Eine Interaktion der entsprechenden Proteine cGvpE und cGvpD aus *Hbt. salinarum* konnte ebenfalls gezeigt werden sowie die Interaktion der heterologen Interaktionspartner mcGvpE-cGvpD und cGvpD-mcGvpE (Scheuch, 2003). Die GvpD-Proteine von *Hbt. salinarum* und *Hfx. mediterranei* weisen eine Sequenzähnlichkeit von 71% auf, und cGvpE und mcGvpE sind zu 41% identisch (Tabelle 1) (Horne *et al.*, 1991). Die Interaktionsstudien mit den heterologen Interaktionspartnern führten zu der Vermutung, dass die Interaktionsbereiche der beiden Proteine in einem konservierten Bereich lokalisiert sein müssen.

Tabelle 1. Prozentuale Aminosäureähnlichkeit der GvpD- und GvpE-Proteine verschiedener *vac*-Regionen nach Horne *et al.* (1991).

	p-vac/c-vac	c-vac/mc-vac	mc-vac/p-vac
GvpD			
% Proteinidentität	71	71	75
GvpE			
%Proteinidentität	49	41	57

Die Werte wurden mit dem Programm 'bestfit' (Deveraux *et al.*, 1984) erhalten.

Weiterhin wurden Interaktionsstudien mit bereits vorhandenen mcGvpD-Mutanten (Pfeifer *et al.*, 2001), die Substitutionen in den für die Funktion des GvpD-Proteins wichtigen Bereichen aufweisen, durchgeführt. Untersucht wurden mcGvpD-Mutanten mit Substitutionen im *p-loop*-Motiv, in bR1 und bR2. Keine der untersuchten mcGvpD-Mutanten hat die Fähigkeit zur Interaktion mit mcGvpE verloren (Scheuch, 2003). Eine mcGvpD-Deletionsmutante, die aus

der N-terminalen Domäne des Proteins bestand (362 AS), war dagegen nicht mehr in der Lage mit mcGvpE zu interagieren (Scheuch, 2003).

In *Hfx. volcanii*-Transformanten, die die *mc-gvpDE*-Gene unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors in pJAS35 exprimieren (DE^{ex}), ist das mcGvpE-Protein nicht nachweisbar (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Dagegen sind in ΔDE^{ex} -Transformanten (918 bp Deletion im *mc-gvpD*-Gen) und E^{ex} -Transformanten große Mengen des mcGvpE-Proteins vorhanden (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Diese Ergebnisse deuteten an, dass die Gegenwart von mcGvpD eine starke Reduktion der mcGvpE-Menge induziert (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Außerdem können in DE^{ex} -Transformanten keine 61 kDa mcGvpD-Proteine nachgewiesen werden, sondern nur kleinere Degradationsprodukte des mcGvpD-Proteins (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Es wäre also denkbar, dass sich die beiden Proteine gegenseitig destabilisieren (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Die Interaktion von GvpD und GvpE könnte zu einem modifizierten oder strukturell veränderten GvpE-Protein führen, das keine aktivatorische Funktion mehr besitzt und/oder schneller degradiert wird. Die Degradation von GvpE könnte somit Teil der negativen P_A -Promotorkontrolle sein (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Die Bindung und Hydrolyse von ATP durch das *p-loop*-Motiv von GvpD könnte die Energie für die strukturelle Veränderung von GvpE liefern oder möglicherweise zu einer Phosphorylierung von GvpE führen (Zimmermann & Pfeifer, 2003).

Die Aminosäuresequenzen der GvpD-Proteine weisen eine signifikante Ähnlichkeit zu RadA- und KaiC-Proteinen in einem Bereich von ca. 250 Aminosäuren auf (Anhang 7.2). Dieser Bereich beinhaltet die Sequenz der *p-loop*-Motivs sowie der basischen Region 1. Bei RadA-Proteinen handelt es sich um die archaealen Homologe der RecA-Rekombinasen, die eine zentrale Rolle bei der DNA-Reparatur durch homologe Rekombination spielen (Radding, 1989; Kowalczykowski & Eggleston, 1994; Seitz *et al.*, 1998). KaiC-Proteine sind an der Festlegung der inneren Uhr in Cyanobakterien beteiligt (Ishiura *et al.*, 1998; Iwasaki *et al.*, 1999). Das *kaiC*-Gen stellt eine duplizierte Version des *recA*-ähnlichen Gens dar (Iwasaki *et al.*, 1999; Leipe *et al.*, 2000). Die RadA- und KaiC-Proteine gehören zur RecA-Superfamilie der ATPasen (Leipe *et al.*, 2000; Iyer *et al.*, 2004). Mitglieder dieser Familie besitzen die Fähigkeit, oligomere (meist hexamere) Ringstrukturen auszubilden (Egelman *et al.*, 1995; Gomis-Ruth *et al.*, 2001; Leipe *et al.*, 2000), wobei die Nukleotid-Bindungsdomänen an den Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten lokalisiert sind und die Bindung von ATP die Oligomerisierung stabilisiert. Weiterhin assemblieren RecA-Proteine in Gegenwart von DNA zu helikalen Filamenten (Story *et al.*, 1992; Kowalczykowski *et al.*, 1994; VanLoock *et al.*, 2003). In Abwesenheit der Substrat-DNA liegt das Protein als komplexe heterogene Mischung von verschiedenen Oligomeren vor (Ogawa *et al.*, 1979; McEntee *et al.*, 1981; Flory *et al.*, 1982). Es konnte gezeigt werden, dass in dieser Oligomer-Mischung sowohl

Monomere, Hexamere/Heptamere und kurze Filamente enthalten sind (Brenner *et al.*, 1988; Brenner *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1990; Di Capua *et al.*, 1990).

Strukturanalysen archaealer Homologe der RecA-Rekombinasen haben gezeigt, dass diese Proteine ebenfalls oligomere Ringstrukturen oder Filamente ausbilden. Die Ausbildung von Biheptameren konnte für das Rad51-Protein aus *Pyrococcus furiosus* (Shin *et al.*, 2003) gezeigt werden. Das Rad51 Protein aus *Sulfolobus solfataricus* bildet dagegen Oktamere aus (Yang *et al.*, 2001b). Der Oligomerisierungszustand dieser Proteine scheint somit von Spezies zu Spezies zu variieren. Für das RadA-Protein aus *Methanococcus voltae* konnten filamentöse Strukturen nachgewiesen werden (Wu *et al.*, 2004). Das zirkadiane KaiC-Protein aus *Synechococcus elongatus* PCC 7942 bildet Homoheptamere aus (Pattanayek *et al.*, 2004). Die Zugabe von ATP stimuliert eine Phosphorylierung von KaiC und die Bildung der hexameren Ringstrukturen (Mori *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2003). Weiterhin konnte eine Bindung von DNA für KaiC gezeigt werden (Mori *et al.*, 2002).

2.7 Zielsetzungen der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war die detaillierte Charakterisierung der Interaktion der beiden in die Regulation der Gasvesikelbildung involvierten Proteine GvpD und GvpE. Hierbei lag ein Schwerpunkt des Interesses auf der Identifizierung des Bereichs im mcGvpD-Protein, der mit GvpE interagiert. Zur Lokalisierung dieses Bereichs sollten verschiedene mcGvpD-Deletionsmutanten hergestellt werden, um deren Interaktionsfähigkeit mit dem mcGvpE-Protein zu untersuchen. Es war ebenfalls beabsichtigt, die Interaktion der nativen Proteine in einer quantitativeren Weise durch Bindungsstudien mit zwei gereinigten Proteinen zu untersuchen.

Ein weiteres Vorhaben dieser Arbeit war eine nähere Untersuchung der mcGvpD-induzierten Reduktion der GvpE-Proteinmenge in *Hfx. volcanii*-Transformanten. Diese Analysen erforderten die Konstruktion eines zweiten Expressionsvektors, um beide Gene in ihrer nativen oder mutierten Form in *Hfx. volcanii*-Transformanten einbringen zu können. Hier sollte ermittelt werden, ob eine Reduktion der mcGvpE- oder cGvpE-Menge auch durch verschiedene mcGvpD-Mutanten induziert wird, um Hinweise über die Regionen des mcGvpD-Proteins zu erhalten, die für die destabilisierende Wirkung auf GvpE eine Rolle spielt. Auch die Bedeutung verschiedener konservierter Aspartatreste für die Stabilität von cGvpE-Mutanten in $cE_{Mut}^{ex}+mcD_{pWL-fdx}$ -Transformanten sollte hier untersucht werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte die Quartärstruktur des mcGvpD-Proteins mittels Gelfiltration, nativer Gelelektrophorese und Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation untersucht werden. Diese Analysen sollten dazu beitragen, die Funktion des repressorischen Proteins mcGvpD näher zu verstehen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Hilfsmittel

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid (30% w/v)/Bisacrylamid (0,8% w/v)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose Seakem ® ME	Cambrex Bio Science, Rockland
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Roche Diagnostics, Mannheim
BioTrace TM Nitrozellulosemembran	Pall Gelman GmbH, Dreieich
Biodyne A Nylonmembran	Pall Gelman GmbH, Dreieich
BioTrace TM PVDF-Membran	Pall Gelman GmbH, Dreieich
Blockierungsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
BSA (Bovine Serum Albumin)	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue (G-250+R-250)	Serva, Heidelberg
CSPD	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG DNA / DIG RNA Labelling Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
ε-Aminocapronsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
ECL TM Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences, UK
Ethidiumbromid	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
HEPES	LS Labor-Service GmbH, Darmstadt
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG)	Roche Diagnostics, Mannheim
Kanamycin	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Long Ranger ® gel solution	BMA, Rockland
Lovastatin (Mevinolin-Derivat)	Geschenk von MSD Sharpe & Dome
MES	LS Labor-Service GmbH, Darmstadt
Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose)	Qiagen, Hilden
Novobiocin	Sigma, St. Louis, USA
ortho-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid (ONPG)	Merck, Darmstadt
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma, St. Louis, USA
Röntgenfilme (Amersham Hyperfilm ECL)	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
<i>Strep</i> -Tactin Sepharose <i>gravity flow</i> Säule (1ml)	IBA, Göttingen

Superose 6	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
TEMED (N´N´N´N´-Tetramethylethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Tricin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tris-Bis	LS Labor-Service, Darmstadt
Tween-20	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Die hier nicht explizit aufgeführten Chemikalien und Hilfsmittel wurden von den Firmen AppliChem, Boehringer Ingelheim, Merck, Roth, Sigma und Serva bezogen. Die Bestandteile für Nährmedien stammten von den Firmen Bacto, Difco und Oxoid.

3.1.2 Enzyme und Kits

Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, New England Biolabs, Stratagene, USB, Roche Diagnostics
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Invitrogen, USA
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, USA
T4-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T3/T7-RNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Qiaprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
SequiTherm EXCEL™ II Sequencing Kit	Biozym, Oldendorf
DIG Luminescent Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim

3.1.3 Größenstandards

DNA-Größenstandard

Gene Ruler™ DNA Ladder Mix # SM 0331	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
--------------------------------------	-----------------------------

Protein-Größenstandard

Protein Molecular Weight Marker # SM 0431	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
---	-----------------------------

RNA-Größenstandard

0,24-9,5 kb RNA-Ladder	Invitrogen, USA
0,5-10 kb RNA-Ladder	Invitrogen, USA

3.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 2. Synthetische Oligonukleotide (MWG-Biotech, Invitrogen, Biomers), die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Name	Oligonukleotidsequenz*	Position
pJAS	CGACACCCGGCGAGAGAGGT	
M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAGTGAGC	
M13 Reverse	CACACAGGAAACAGCTATGA	
D-Nterm318	TCCCGGTACCT CA GGGAACAACGG	5279-5255 ^a
D-Nterm362	CGGTGTCGGTACCTGCC CT ATTCCTC	5419-5393 ^a
D-Nterm426	GGCCGGTACCT CA GGGTGACTCG	5603-5581 ^a
D-Nterm447	GGGGGGTACCT CA CTGTTTTCGG	5666-5644 ^a
D-Nterm502	GCCGGGTACCT CA GTCTGCGACG	5831-5809 ^a
D-Cterm356	CATCGCC ATG GGTGTGTCACGTTG	4870-4894 ^a
D-Cterm233	AACGCC ATG GGCGTCGCCG	5240-5258 ^a
D-Cterm119	GAACTCGAGTCC ATG GTCGAGGGAG	5576-5599 ^a
D-ploop_f	GGTCACACGCTGCTGTTACAGATA	4405-4462 (Δ4417-4450) ^a
D-ploop_r	TATCGTGAACAGCAGCGTGTGACC	4462-4405 (Δ4450-4417) ^a
D-G32-L35_f	ACTGGCGACCCACTCGTTAACGGA	4394-4429 (Δ4406-4417) ^a
D-G32-L35_r	TCCGTTAACGAGTGGGTCGCCAGT	4429-4394 (Δ4417-4406) ^a
fdxProm-BspHI	GTTATCATGAGGCTTTCGTGG	
BamD ¹	GTGCGGGATCCATGGCCCCACC	4301-4322 ^a
BamE ¹	GAGATGGTGGGATCCATGGAACGGCTC	5938-5964 ^a
HinE ¹	GTAAGTGAAGCTTTTATCGCTCATTGG	6544-6518 ^a
E-Ex-HindIII ²	GCCGTACGTGTAGAGGTAAGCTTCACTCATC	3852-3883 ^b
E-Mut-ZIP S ²	CGCCATCGAGCACGTC <u>GG</u> CAGCGTC <u>CG</u> CCTGCAGTTGCT	4003-3931 ^b
pJAS ³	AGTCGAGGACGACTACGACG**	
pWL ³	CCGACAGCAGGGACGGCTGG**	
pWL(Nco)	AGACGAGACGGTTCAGACGC**	
Universal	TTGTAAAACGACGGCCAGT**	622-640 ^c
T7	TAATACGACTCACTATAGGG**	20-39 ^d

* Kursiv gekennzeichnete oder unterstrichene Stellen markieren Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme. Start- bzw. Stopcodons sind fett dargestellt. Positionen mit Basenaustausch sind unterstrichen.

** Oligonukleotide mit 5'-Infrarotfarbstoff-Modifikation für die DNA-Sequenzbestimmung.

^a Bindestellen innerhalb der mc-vac-Sequenz (Genbank accession number X64701).

^b Bindestellen innerhalb der c-vac-Sequenz (Genbank accession number X94688).

^c Bindestellen innerhalb des Plasmidvektors pBlueskript II SK(+) (Stratagene).

^d Bindestellen innerhalb des Plasmidvektors pPR-IBA2 (IBA, Göttingen).

¹ Zur Verfügung gestellt von Peter Zimmermann.

² Zur Verfügung gestellt von Petra Plöber.

³ Zur Verfügung gestellt von Simone Sartorius-Neef.

3.1.5 Verwendete Mikroorganismen

<i>Escherichia coli</i> TOP10F ⁺	Invitrogen, USA
<i>Escherichia coli</i> GM1674 <i>dam</i> ⁻	Palmer & Marinus, 1994
<i>Escherichia coli</i> M15	Qiagen, Hilden
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE) pLysS	Novagen, Merck Biosciences, Darmstadt
<i>Haloferax volcanii</i> WFD11	Cline <i>et al.</i> , 1989
<i>Haloferax mediterranei</i> DSM1411	Rodriguez-Valera <i>et al.</i> , 1980 & 1983
<i>Halobacterium salinarum</i> R1	Stoeckenius & Kunau, 1968

3.1.6 Verwendete Plasmidvektoren (Antibiotika-Resistenzen)

pBluescript II SK(+) (Ampicillin ^R)	Stratagene, La Jolla
pBluescript II KS(+) (Ampicillin ^R)	Stratagene, La Jolla
pQE8 (Ampicillin ^R)	Qiagen, Hilden
pPR-IBA2 (Ampicillin ^R)	IBA, Göttingen
pREP4 (Kanamycin ^R)	Qiagen, Hilden
pLysS (Chloramphenicol ^R)	Stratagene, USA
pJAS35 (Ampicillin ^R , Novobiocin ^R)	Pfeifer <i>et al.</i> , 1994
pWL102 (Ampicillin ^R , Mevinolin ^R)	Lam & Doolittle, 1989
pLysS (Chloramphenicol ^R)	Studier & Moffat, 1986

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Wachstumsbedingungen

Escherichia coli-Stämme wurden aerob bei 37 °C in LB-Medium (Sambrook & Russell, 2001) angezogen. Flüssigkulturen wurden bei 180 upm auf einem Schüttler inkubiert. Um Transformanten zu selektieren, wurden dem Medium 100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin und/oder 50 µg/ml Chloramphenicol in Abhängigkeit der vorhandenen Resistenzgenen zugegeben.

Haloferax volcanii WFD11 wurde in Vollmedium (VM) mit 21,6% Salz angezogen, welches 3 M NaCl, 150 mM MgSO₄, 40 mM KCl, 10 nM MnCl₂, 25 mM Tris-HCl pH 7,2, 0,05% (w/v) CaCl₂, 0,5% (w/v) Trypton, 0,3% (w/v) Hefeextrakt enthält. Flüssigkulturen wurden aerob bei 37 °C und 180 upm und Kulturen auf Festmedien bei 42 °C inkubiert. Um Transformanten zu selektieren, wurden dem Medium 0,2 µg/ml Novobiocin bzw. 6 µg/ml Mevinolin in Abhängigkeit der vorhandenen Resistenzgene zugegeben.

Halobacterium salinarum R1 wurde in *Hbt. salinarum* Vollmedium mit 27,2% Gesamtsalz (überwiegend NaCl) angezogen, welches 4,28 M NaCl, 81 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 27 mM KCl, 1,5% (w/v) Oxoid-Pepton, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 enthält. Flüssigkulturen wurden aerob bei 37°C und 180 upm und Kulturen auf Festmedien bei 42°C inkubiert.

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) wurden DNA-Fragmente der mc-vac-Region amplifiziert und mit Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen zur Klonierung in Plasmidvektoren versehen.

Die PC-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl in dem rechnergesteuerten Thermostaten Hybaid Omn-E Gene (MWG-Biotech) durchgeführt.

Der initiale Denaturierungsschritt der DNA-Stränge der Matrize erfolgte für 5 min bei 94°C. Die Temperatur für die Anlagerung der synthetischen Oligonukleotide wurde entsprechend ihrer Länge und ihres GC-Gehaltes gewählt und lag zwischen 50-60°C. Die Anlagerung wurde für 30-60 sec durchgeführt. Im dritten Schritt erfolgte die Polymerisation bei 72°C für einen Zeitraum, der von der Länge der zu amplifizierenden DNA abhängig war (1 min pro 1 kb). Die drei PCR-Schritte wurden 30- bis 35-mal wiederholt, wobei die Denaturierung nur für 45 sec bei 94°C durchgeführt wurde. Im letzten PCR-Zyklus wurde die Polymerisationszeit auf 10 min erhöht, um alle neu synthetisierten DNA-Stränge vollständig zu verlängern. Ein PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 50 ng genomische DNA oder 50 pg Plasmid-DNA, 1-3 mM MgCl₂, 0,4 µM Primer 1 und 2, 0,24 mM dNTP-Mix, 1/10 Volumen 10x *Taq*-Reaktionspuffer, 1,9 U *Taq*-Polymerase und 0,05 U *Pfu*-Polymerase. Der PCR-Ansatz wurde mit deionisiertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt.

3.2.3 *In vitro*-Mutagenese-PCR

Die Methode der rekombinanten PCR nach Lottspeich & Zorbas (1998) wurde verwendet, um bestimmte Bereiche in einer DNA-Sequenz zu deletieren. Dies erfolgte zunächst durch zwei getrennte PCRs, deren Amplifikate in einer dritten PCR fusioniert wurden. In den ersten beiden PCRs wurde jeweils mit Hilfe eines Randprimers und eines Mutagenese-Primers die Matrize so amplifiziert, dass der zu deletierende Bereich ausgespart wurde. Die beiden Mutagenese-Primer enthielten an ihrem 5'-Ende zueinander komplementäre Sequenzen, so dass die entstehenden PCR-Produkte in einer dritten PCR aufgrund der Anlagerung der komplementären Bereiche mit den beiden Randprimern zusammengefügt werden konnten.

3.2.4 Molekularbiologische Standardtechniken

Die hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Elektrophorese wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Als Gelpuffer diente 1x TAE-Puffer (Tris/Acetat/EDTA-Puffer, Sambrook & Russell, 2001), und 0,5x TAE-Puffer wurde als Laufpuffer verwendet. Zur Ermittlung der Fragmentgrößen wurde der GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331 (MBI Fermentas) als DNA-Größenstandard eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer versetzt (0,25% Bromphenolblau, 50% Saccharose, 0,1 M EDTA). Durch Färben der Agarosegele mit Ethidiumbromid (1 µg/ml in Wasser) und Entfärben mit Wasser, konnten die DNA-Fragmente durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden (Sambrook & Russell, 2001).

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Die Entfernung von Proteinen aus einer DNA-Lösung wurde mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol- oder Isopropanolpräzipitation der DNA durchgeführt (Sambrook & Russell, 2001).

Für die Ligation wurden Vektor- und Insert-DNA in einem Verhältnis an freien Enden von 1:5 bis 1:10 zusammen gegeben (Sambrook & Russell, 2001) und für 1 h bei 20 °C mit der T4-Ligase (New England Biolabs) in T4-Ligase-Reaktionspuffer inkubiert.

Die Transformation von *E. coli* erfolgte mit kompetenten Zellen, die nach der RbCl₂-Methode (<http://research.nwfsc.noaa.gov/protocols/rbcl.html>) hergestellt wurden. Die DNA-Aufnahme wurde durch einen Hitzeschock der Zellen nach den gängigen Methoden erreicht (Sambrook & Russell, 2001).

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für hier nicht explizit aufgeführte molekularbiologische Standardtechniken wurden Protokolle nach Sambrook & Russell (2001) verwendet.

3.2.5 Sequenzbestimmung von DNA-Fragmenten

Die Bestimmung der DNA-Sequenz eines Plasmidkonstruktes erfolgte mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Für die Sequenzreaktionen wurde das *SequiTherm EXCEL II* Long-Read Sequencing Kit-LC (BIOzym) nach dem Protokoll des Herstellers und der rechnergesteuerte Thermostat Robocycler Gradient 40 (Stratagene) verwendet. Die Markierung der neu synthetisierten DNA-Fragmente fand durch den Einsatz von 5'-fluoreszenzmarkierten (IRD 800) Oligonukleotiden (MWG Biotech) in der Sequenzierungsreaktion statt. Die Auftrennung und Detektion der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente erfolgte mit einem LICOR DNA Sequencer 4000 bei 1200 V, 35 mM und

50°C für 7 h. Die harnstoffhaltigen Polyacrylamidgele wurden mit Long Ranger gel solution (BMA, Rockland) hergestellt. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer (Tris/Borat/EDTA-Puffer, Sambrook & Russell, 2001).

Vektor	5'-fluoreszenzmarkierte (IRD 800) Oligonukleotide	
pJAS35	pJAS	(MWG Biotech, Ebersberg)
	Universal	"
pWL102	pWL	"
	pWL(Nco)	"
pPR-IBA2*	T7	"

3.2.6 Konstrukte für die Transformation von *E. coli*

Die synthetischen Oligonukleotide, die für die Herstellung verschiedener Plasmidkonstrukte verwendet wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Konstrukte für die Transformation von *E. coli* M15

c-gvpE-pQE8 enthält das 591 bp *Bam*HI-*Hind*III-Fragment des c-gvpE-Leserahmens inseriert in den His-tag-Expressionsvektor pQE8 (Krüger & Pfeifer, 1996).

mc-gvpD-pQE8 enthält das 1648 bp *Bam*HI-*Hind*III-Fragment des mc-gvpD-Leserahmens inseriert in den His-tag-Expressionsvektor pQE8 (Zimmermann & Pfeifer, 2003).

mc-gvpE-pQE8 enthält das 589 bp *Bam*HI-*Hind*III-Fragment des mc-gvpE-Leserahmens inseriert in den His-tag-Expressionsvektor pQE8 (Zimmermann & Pfeifer, 2003).

Konstrukte für die Transformation von *E. coli* BL21(DE3) pLysS

pPR-IBA2* ist eine modifizierte Form des pPR-IBA2-Vektors (IBA, Göttingen). Der pPR-IBA2-Vektor enthält am 5'-Ende der Klonierungsregion eine Sequenz, die für einen *Strep*-tag II kodiert. Die hydrolytische Spaltung des Vektors mit *Nar*I und *Sma*I, anschließendes Glätten des durch *Nar*I erzeugten 3'-Überhangs mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase und Religation der beiden glatten Enden, resultierte im Vektor pPR-IBA2*, in den Leserahmen im Leseraster zum Startcodon des *Strep*-tag II mittels der beiden Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Hind*III inseriert werden können.

c-gvpE-pPR-IBA2* enthält das 591 bp *Bam*HI-*Hind*III-Fragment des c-gvpE-Leserahmens in pPR-IBA2*. Das *Bam*HI-*Hind*III-c-gvpE-Fragment wurde durch hydrolytische Spaltung von c-gvpE-pQE8 (Krüger & Pfeifer, 1996) erhalten und in pPR-IBA2* inseriert.

mc-gvpD-pPR-IBA2* enthält das 1648 bp *Bam*HI-*Hind*III-Fragment des mc-gvpD-Leserahmens in pPR-IBA2*. Das *Bam*HI-*Hind*III-mc-gvpD-Fragment wurde durch hydrolytische Spaltung von mc-gvpD-pQE8 (Zimmermann & Pfeifer, 2003) erhalten und in pPR-IBA2* inseriert.

mc-gvpE-pPR-IBA2* enthält das 589 bp *Bam*HI-*Hind*III-Fragment des mc-gvpE-Leserahmens in pPR-IBA2*. Für die Herstellung des 606 bp PCR-Produktes wurden die Oligonukleotide BamE und HinE (Zimmermann & Pfeifer, 2003) und genomische DNA von *Hfx. mediterranei* als Matrize verwendet.

mc-gvpD_{Mut6}-pPR-IBA2* enthält das 1681 bp *Bam*HI-*Hind*III-Fragment des substituierten mc-gvpD-Leserahmens in pPR-IBA2*. Das *Bam*HI-*Hind*III-mc-gvpD_{Mut6}-Fragment wurde durch hydrolytische Spaltung von mc-gvpD_{Mut6}-pBSISK+ (Zotzel, 1998) erhalten und in pPR-IBA2* inseriert.

3.2.7 Transformation von *Hfx. volcanii* WFD11

Für die Transformation von *Hfx. volcanii* WFD11 wurden die Plasmidkonstrukte durch *E. coli* GM1674 (*dam*⁻) passagiert, um eine halobakterielle Restriktionsbarriere zu umgehen (Holmes *et al.*, 1991). Zur Expression von Leserahmen ohne eigenen Promotor wurde der halobakterielle *shuttle*-Vektor pJAS35 (Pfeifer *et al.*, 1994) verwendet, dessen Ferredoxin-Promotor (*fdx*-Promotor) (Pfeifer *et al.*, 1993) bereits während der frühen exponentiellen Wachstumsphase zu einer starken Expression der inserierten Leserahmen führt. Mit Hilfe des Vektors pWL102 (Lam & Doolittle, 1989) können Gene unter ihrer nativen Promotorkontrolle exprimiert werden. Die Transformation erfolgte nach dem Protokoll von Pfeifer & Ghahraman (1993). Das Vorhandensein der Plasmidkonstrukte in den halobakteriellen Transformanten wurde mittels Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide und gegebenenfalls durch Southern-Analyse kontrolliert.

3.2.8 Konstrukte für die Transformation von *Hfx. volcanii* WFD11

Die synthetischen Oligonukleotide, die für die Herstellung verschiedener Plasmidkonstrukte verwendet wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

gvp-Leserahmen im Expressionsvektor pJAS35:

mcD^{ex} enthält das 1651 bp *Nco*I-*Acc*65I-Fragment des mc-gvpD-Leserahmens, das in pJAS35 inseriert wurde (Röder, 1997).

mcE^{ex} enthält das 597 bp PCR-Fragment mit dem Leserahmen von mc-gvpE in pJAS35. Aufgrund einer natürlich vorkommenden *Acc*65I-Schnittstelle in mc-gvpE erfolgte die Inserierung in pJAS35 mittels der *Nco*I-Schnittstelle und einer geglätteten *Acc*65I-Schnittstelle (Röder, 1997).

his-gvp-Fusionsleserahmen im Expressionsvektor pJAS35:

mcD_{his}^{ex} enthält das 1679 bp *Bsp*HI-*Acc*65I-6x*his*-mc-gvpD-Fragment im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35. Das Konstrukt wurde durch Inserierung eines 496 bp *Bsp*HI-*Eco*RV-Fragmentes (erhalten durch Verwendung des mc-gvpD-pQE8-Konstruktes (Zimmermann & Pfeifer, 2003) als Matrize für die PCR und anschließende hydrolytische Spaltung) in das *Nco*I-*Eco*RV hydrolytisch gespaltene mcD^{ex}-Konstrukt (Röder, 1997) hergestellt (Zimmermann unveröffentlicht, 2003).

mcE_{his}^{ex} enthält das 633 bp *Bsp*HI-*Acc*65I-6x*his*-mc-*gvpE*-Fragment im halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35. Das Konstrukt wurde durch die Inserierung eines 392 bp *Bsp*HI-*Acc*65I-Fragmentes (erhalten durch Verwendung des mc-*gvpE*-pQE8-Konstruktes (Zimmermann & Pfeifer, 2003) als Matrize für die PCR und anschließende hydrolytische Spaltung) in das *Nco*I-*Acc*65I hydrolytisch gespaltene mcE^{ex}-Konstrukt (Röder, 1997) hergestellt (Zimmermann unveröffentlicht, 2003).

cE_{his}^{ex} enthält das 652 bp *Nco*I-*Acc*65I-Fragment bestehend aus dem c-*gvpE*-Leserahmen dessen Stopcodon gegen eine Nukleotid-Sequenz ausgetauscht wurde, die für ein Alanin kodiert. Daran schließen sich 6 Nukleotide an, die für Valin und Serin kodieren, gefolgt von einer Sequenz, die für 6 Histidine, ein Glycin und ein Stopcodon kodiert (Plöber, 1998).

Substituierte mc-*gvpD*-Leserahmen im Expressionsvektor pJAS35:

Bei allen folgenden substituierten mc-*gvpD*-Leserahmen im Expressionsvektor pJAS35 handelt es sich immer um das Gen der mc-vac-Region aus *Hfx. mediterranei*, deshalb wurde auf das den Zusatz „mc“ verzichtet.

D_{Mut1}^{ex} enthält das 1713 bp *Nco*I-*Acc*65I-Fragment des mc-*gvpD*-Leserahmens mit einer Substitution von einem Nukleotid im Bereich des *p-loop*-Motivs (Position 116) in pJAS35. Die Substitution verursacht eine Punktmutation in der Aminosäuresequenz des mcGvpD-Proteins (G39A) (Pfeifer *et al.*, 2001).

D_{Mut6}^{ex} enthält das 1713 bp *Nco*I-*Acc*65I-Fragment des mc-*gvpD*-Leserahmens mit einer Substitution von 3x 2 Nukleotiden im Bereich des *p-loop*-Motivs (Position 116-117, 125-126, 131-132) in pJAS35. Die Substitutionen führen zu 3 Punktmutationen in der Aminosäuresequenz des mcGvpD-Proteins (G39E), (G42D) und (G44D) (Pfeifer *et al.*, 2001).

D_{AEAE}^{ex} enthält das 1713 bp *Nco*I-*Acc*65I-Fragment des mc-*gvpD*-Leserahmens mit einer Substitution von 4x 2 Nukleotiden im Bereich der basischen Region 1 (Position 601-602, 607-608, 613-614, 616-617) in pJAS35. Die Substitutionen führen zu 4 Punktmutationen in der Aminosäuresequenz des mcGvpD-Proteins (R201A), (R203E), (R205A) und (R206E) (Pfeifer *et al.*, 2001).

D_{3-ADA}^{ex} enthält das 1713 bp *Nco*I-*Acc*65I-Fragment des mc-*gvpD*-Leserahmens mit einer Substitution von 6 Nukleotiden im Bereich der basischen Region 2 (Position 1480-1481, 1483-1484, 1486-1487) in pJAS35. Die Substitutionen führen zu 3 Punktmutationen in der Aminosäuresequenz des mcGvpD-Proteins (R494A), (R495D) und (R496A) (Pfeifer *et al.*, 2001).

D_{3-AAA}^{ex} enthält das 1713 bp *Nco*I-*Acc*65I-Fragment des mc-*gvpD*-Leserahmens mit einer Substitution von 6 Nukleotiden im Bereich der basischen Region 2 (Position 1480-1481, 1483-1484, 1486-1487) in pJAS35. Die Substitutionen führen zu 3 Punktmutationen in der Aminosäuresequenz des mcGvpD-Proteins (R494A), (R495A) und (R496A) (Pfeifer *et al.*, 2001).

Deletierte mc-*gvpD*-Leserahmen im Expressionsvektor pJAS35:

Bei allen folgenden substituierten mc-*gvpD*-Leserahmen im Expressionsvektor pJAS35 handelt es sich immer um das Gen der mc-vac Region aus *Hfx. mediterranei*, deshalb wurde auf das den Zusatz „mc“ verzichtet.

D_{Δp-loop}^{ex} enthält das 1618 bp Fragment des mc-*gvpD*-Leserahmens dessen Nukleotid-Sequenz des p-loop-Motivs deletiert wurde in der NcoI- und Acc65I-Schnittstelle von pJAS35. Das Δp-loop-Fragment wurde mittels rekombinanter PCR zur Deletion von DNA-Sequenzen hergestellt. Zunächst wurden in zwei getrennten PCR-Ansätzen mit mcD^{ex} als Matrize und den Oligonukleotiden D-ploop_r und pJAS oder D-ploop_f und M13 Forward* zwei Fragmente synthetisiert, die in einer dritten PCR mit den Primern pJAS und M13 Forward* fusioniert wurden.

D_{ΔG-L}^{ex} enthält das 1639 bp Fragment des mc-*gvpD*-Leserahmens mit einer Deletion von 12 Nukleotiden stromaufwärts der p-loop-Sequenz in der NcoI- und Acc65I-Schnittstelle von pJAS35 und wurde in analoger Weise zum Δp-loop-Fragment mittels rekombinanter PCR hergestellt. Für die ersten zwei getrennten PCR-Ansätze wurden mcD^{ex} als Matrize und die Oligonukleotide D-G32-L35_r und pJAS oder D-G32-L35_f und M13 Forward* verwendet. Die erhaltenen Amplifikate wurden in der dritten PCR mit den Primern pJAS und M13 Forward* fusioniert.

D_{Nterm318}^{ex} enthält das 1007 bp NcoI-Acc65I-Fragment des mc-*gvpD*-Leserahmens, der mittels Insertion eines Stopcodons an Position 955-957 verkürzt wurde, inseriert in den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35. Das D_{Nterm318}-Fragment wurde mittels PCR mit mc-*gvpD*-pQE8 als Matrize und den Oligonukleotiden D-Nterm318 und BamD hergestellt. Die Insertion in pJAS35 erfolgte mit Hilfe der künstlich eingeführten NcoI- und Acc65I-Schnittstellen.

D_{Nterm362}^{ex} enthält das 1100 bp NcoI-Acc65I-Fragment des mc-*gvpD*-Leserahmens, der mittels Insertion eines Stopcodons an Position 1087-1089 verkürzt wurde, inseriert in den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35 (Scheuch, 2003).

D_{Nterm426}^{ex} enthält das 1291 bp NcoI-Acc65I-Fragment des mc-*gvpD*-Leserahmens, der mittels Insertion eines Stopcodons an Position 1279-1281 verkürzt wurde, inseriert in den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35. Das D_{Nterm426}-Fragment wurde mittels PCR mit mc-*gvpD*-pQE8 als Matrize und den Oligonukleotiden D-Nterm426 und BamD hergestellt. Die Insertion in pJAS35 erfolgte mit Hilfe der künstlich eingeführten NcoI- und Acc65I-Schnittstellen.

D_{Nterm447}^{ex} enthält das 1354 bp NcoI-Acc65I-Fragment des mc-*gvpD*-Leserahmens, der mittels Insertion eines Stopcodons an Position 1342-1344 verkürzt wurde, inseriert in den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35. Das D_{Nterm447}-Fragment wurde mittels PCR mit genomischer DNA aus *Hfx. mediterranei* als Matrize und den Oligonukleotiden D-Nterm447 und pJAS hergestellt. Die Insertion in pJAS35 erfolgte mit Hilfe der künstlich eingeführten NcoI- und Acc65I-Schnittstellen.

D_{Nterm502}^{ex} enthält das 1519 bp NcoI-Acc65I-Fragment des mc-*gvpD*-Leserahmens, der mittels Insertion eines Stopcodons an Position 1507-1509 verkürzt wurde, inseriert in den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35. Das D_{Nterm502}-Fragment wurde mittels PCR mit genomischer DNA aus *Hfx. mediterranei* als Matrize und den Oligonukleotiden D-Nterm502 und pJAS hergestellt. Die Insertion in pJAS35 erfolgte mit Hilfe der künstlich eingeführten NcoI- und Acc65I-Schnittstellen.

D_{Cterm119}^{ex} enthält das 370 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *mc-gvpD*-Leserahmens, dessen erste 1275 bp mittels Deletion des ursprünglichen und Insertion eines neuen Startcodons an Position 1276-1278 deletiert wurden, inseriert in den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35. (Scheuch, 2003).

D_{Cterm233}^{ex} enthält das 712 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *mc-gvpD*-Leserahmens, dessen erste 933 bp mittels Deletion des ursprünglichen und Insertion eines neuen Startcodons an Position 934-936 deletiert wurden, inseriert in den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35. Das **D_{Cterm233}**-Fragment wurde mittels PCR mit **mcD^{ex}** als Matrize und den Oligonukleotiden **D-Cterm233** und **M13 Forward*** hergestellt. Die Insertion in pJAS35 erfolgte mit Hilfe der künstlich eingeführten *NcoI*- und *Acc65I*-Schnittstellen.

D_{Cterm356}^{ex} enthält das 1081 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *mc-gvpD*-Leserahmens, dessen erste 564 bp mittels Deletion des ursprünglichen und Insertion eines neuen Startcodons an Position 565-567 deletiert wurden, inseriert in den halobakteriellen Expressionsvektor pJAS35. Das **D_{Cterm233}**-Fragment wurde mittels PCR mit **mcD^{ex}** als Matrize und den Oligonukleotiden **D-Cterm356** und **M13 Forward*** hergestellt. Die Insertion in pJAS35 erfolgte mit Hilfe der künstlich eingeführten *NcoI*- und *Acc65I*-Schnittstellen.

c-gvpE und c-gvpE_{Mut} Leserahmen im Expressionsvektor pJASt:

pJASt stellt ein Derivat des Expressionsvektors pJAS35 (Pfeifer *et al.*, 1994) dar. Im pJASt-Vektor wurde die Sequenz, die für die Dihydrofolatreduktase kodiert entfernt und durch eine multiple Klonierungsregion ersetzt, die neben den Schnittstellen für *NcoI* und *Acc65I* auch eine Schnittstelle für *NdeI* enthält. In 3' Richtung der *Acc65I*-Schnittstelle wurde die *p-gvpA*-Terminationssequenz inseriert. (Zimmermann unveröffentlicht, 2003).

cE_{WT}-pJASt enthält das 627 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE* Leserahmens im Expressionsvektor pJASt. Das *NcoI*-*Acc65I*-*c-gvpE*-Fragment wurde durch hydrolytische Spaltung von *c-gvpE*-pBSIIKS+ (Armbruster, 1997) erhalten und in pJASt inseriert (Anderl, 2004).

cE_{Mut1}-pJASt enthält das 627 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden (Position 164-165) in pJASt. Die Substitution führt zu einem Aminosäureaustausch (D55A) in der Aminosäuresequenz der cGvpE-Proteins (Anderl, 2004).

cE_{Mut3}-pJASt enthält das 627 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit Substitution von 2x 2 Nukleotiden (Position 212-213, 215-216) in pJASt. Die Substitutionen führen zu zwei Aminosäureaustauschen (DD71-72AA) in der Aminosäuresequenz des cGvpE-Proteins (Anderl, 2004).

cE_{Mut5}-pJASt enthält das 627 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des *c-gvpE*-Leserahmens mit einer Substitution von 2 Nukleotiden (Position 263-264) in pJASt. Die Substitution führt zu einem Aminosäureaustausch (D88A) in der Aminosäuresequenz der cGvpE-Proteins (Anderl, 2004).

gvp-Leserahmen im Expressionsvektor pWL_{fdx}:

Bei allen folgenden substituierten *mc-gvpD*-Leserahmen im Expressionsvektor pWL_{fdx} handelt es sich immer um das Gen der *mc-vac* Region aus *Hfx. mediterranei*, deshalb wurde auf das den Zusatz „mc“ verzichtet.

pWL_{fdx} ist ein Derivat des halobakteriellen *shuttle*-Vektors pWL102 (Lam & Doolittle, 1989), das den *P_{fdx}*-Promotor als 73 bp Fragment enthält. Leserahmen zur Expression können als *NcoI*-*Acc65I*-Fragmente inseriert werden, wodurch eine 330 bp Sequenz (bestehend aus dem 230 bp p-*gvpA*-Leserahmen, 46 bp stromabwärts des *gvpA*-Stopcodons und 54 bp von pBSIISK+) entfernt wird. Das 469 bp PCR-Produkt wurde mit p-*gvpA*/ΔL-pJAS35 (Sartorius-Neef, 2006) als Matrize und den Oligonukleotiden fdxProm-BspHI und M13 Universal* erzeugt und mit Hilfe der künstlich eingeführten *BspHI* und *Acc65I*-Schnittstellen in pWL102 inseriert. Der halobakterielle *shuttle*-Vektor wurde dazu mit *NcoI* und *Acc65I* hydrolytisch gespalten und mit dem 408 bp *BspHI*-*Acc65I*-*P_{fdx}*-*gvpA*-Fragment ligiert, da *BspHI* und *NcoI* gleiche überhängende Enden erzeugen. Eine schematische Darstellung der Expressionsvektors pWL_{fdx} ist in Kapitel 4.2.1 dargestellt.

cE_{pWL-fdx} enthält das 623 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des c-*gvpE*-Leserahmens inseriert in den halobakteriellen Expressionsvektor pWL_{fdx}. Das *NcoI*-*Acc65I*-c-*gvpE*-Fragment wurde durch hydrolytische Spaltung von cE^{ex} (Plöber & Pfeifer, 2002) erhalten und in pWL_{fdx} inseriert.

mcD_{pWL-fdx} enthält das 1651 bp *NcoI*-*Acc65I*-Fragment des mc-*gvpD*-Leserahmens inseriert in den halobakteriellen Expressionsvektor pWL_{fdx}. Das *NcoI*-*Acc65I*-mc-*gvpD*-Fragment wurde durch hydrolytische Spaltung von mcD^{ex} (Röder, 1997) erhalten und in pWL_{fdx} inseriert.

D_{Mut6}-pWL enthält das 1713 bp *NcoI*-*Acc65I*-D_{Mut6}-Fragment inseriert in den halobakteriellen Expressionsvektor pWL_{fdx}. Das *NcoI*-*Acc65I*-D_{Mut6}-Fragment wurde durch hydrolytische Spaltung von D_{Mut6}^{ex} (Pfeifer *et al.*, 2001) erhalten und in pWL_{fdx} inseriert.

D_{3-AAA}-pWL enthält das 1713 bp *NcoI*-*Acc65I*-D_{AAA}-Fragment inseriert in den halobakteriellen Expressionsvektor pWL_{fdx}. Das *NcoI*-*Acc65I*-3-D_{AAA}-Fragment wurde durch hydrolytische Spaltung von D_{3-AAA}^{ex} (Pfeifer *et al.*, 2001) erhalten und in pWL_{fdx} inseriert.

Subfragmente der mc-vac in pWL102:

mc (BN) enthält das 9487 bp *NheI*-*BglI*-Fragment mit der gesamten mc-vac-Region in pWL102 (Englert *et al.*, 1992b).

ΔD enthält das 9259 bp *PstI*-*BglI*-Fragment mit der mc-vac-Region mit einer 918 bp-Deletion in mc-*gvpD* enthält (Englert *et al.*, 1992b).

bgaH-Fusionskonstrukte in pWL102:

mcA-*bgaH*-ΔDEF enthält das Fusionskonstrukt aus dem 2166 bp mcA-*bgaH*-DEF-Fragment (enthält den mcA-Promotor sowie *gvpDEF* unter der Kontrolle des mc-*gvpD*-Promotors) mit einer 918 bp-*XhoI*-Deletion in mc-*gvpD* und dem 2203 bp *NcoI*-*BamHI*-*bgaH*-Fragment in pWL102. (Zimmermann, 2003)

3.2.9 Plasmidisolierung aus *Hfx. volcanii*

Die Plasmidisolierung aus *Hfx. volcanii* WFD11 wurde mit dem Qiaprep Spin Minprep Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Abweichend vom Protokoll wurde statt des Puffers P1 zum Resuspendieren des Zellsediments (3 ml einer stationären *Hfx. volcanii*-Kultur) der Halobakterien-Resuspendierungspuffer (1 M NaCl, 50 mM Glucose,

10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) verwendet. Die weitere Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.2.10 Nachweis von DNA-Fragmenten mittels Southern-Analyse

Die zu untersuchenden Plasmidkonstrukte wurden nach hydrolytischer Spaltung mit Restriktionsendonukleasen über 1%ige Agarosegele elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Agarosegele für je 20 min in 0,25 M HCl (partielle Depurinierung), dann in 1,5 M NaCl/0,5 M NaOH (Denaturierung) und zuletzt in 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 (Neutralisierung) geschwenkt. Der Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte mittels Kapillarblot (Southern, 1975; Sambrook & Russell, 2001) über Nacht mit 20x SSC-Puffer (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0). Durch Backen der Nylonmembran für 2 h bei 80 °C wurden die DNA-Fragmente nicht-kovalent auf der Membran fixiert. Zum spezifischen Nachweis von DNA-Fragmenten wurden Digoxigenin-markierte DNA-Sonden verwendet. Die Nylonmembran wurde zunächst für 2 h mit Hybridisierungslösung (50% (v/v) Formamid, 2% (v/v) Blockierungsreagenz, 0,1% (v/v) Laurylsarcosin, 0,02% (v/v) SDS, 5x SSC) bei 42 °C blockiert und anschließend mit der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde in Hybridisierungslösung über Nacht inkubiert. Vor der Zugabe zur Membran wurde die DNA-Sonde für 1 min bei 100 °C denaturiert. Das Waschen der Membran erfolgte nach Sambrook & Russell (2001). Die Detektion der DNA-Fragmente wurde mit dem DIG Luminescent Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden

DNA-Sonden wurden mit dem DIG DNA Labelling Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Die DNA-Sonden wurden mittels PCR amplifiziert und dabei durch Einbau von DIG-Desoxyuridintriphosphat (DIG-dUTP) markiert. Die PCR-Zyklusparameter wurden entsprechend des zu vervielfältigenden DNA-Fragmentes gewählt (siehe PCR). Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl in dem rechnergesteuerten Thermostaten Hybaid Omni Gene (MWG Biotech) durchgeführt.

c-*gvpE*-DNA-Sonde

Zur Herstellung der c-*gvpE*-DNA-Sonde wurde das Plasmidkonstrukt c-*gvpE*-pBluescript-II KS+ (Krüger *et al.*, 1998) als Matrize und die synthetischen Oligonukleotide E-Ex-*Hind*III and E-Mut-ZIP S (Plöber & Pfeifer, 2002) für die PCR verwendet, was in der Amplifikation einer 152 bp Digoxigenin-markierten c-*gvpE*-DNA-Sonde resultierte.

mc-gvpE-DNA-Sonde

Zur Herstellung der mc-gvpE-DNA-Sonde wurde genomische DNA von *Hfx. mediterranei* als Matrize und die synthetischen Oligonukleotide BamE und HinE (Zimmermann & Pfeifer, 2003) für die PCR verwendet, was in der Amplifikation einer 606 bp Digoxigenin-markierten mc-gvpE-DNA-Sonde resultierte.

3.2.11 Isolierung von Gesamt-RNA aus Halobakterien

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *Hfx. volcanii*-Transformanten erfolgte nach der Methode von Chomczynski & Sacchi (1987). Für Proben aus der exponentiellen Wachstumsphase wurden 15 ml Kultur mit einer $OD_{600} = 0,2$ bis $0,4$ und für Proben aus der stationären Wachstumsphase wurden 6 ml Kultur mit einer $OD_{600} = 1,6$ bis $1,9$ entnommen. Folgende Abweichungen zum Protokoll wurden vorgenommen: An die erste Fällung der RNA schloss sich eine zweite Phenol-Chloroform-Extraktion an. Das RNA-Sediment der zweiten Isopropanol-Präzipitation wurde mit 70% Ethanol (in DEPC-behandeltem, deionisiertem Wasser) gewaschen, anschließend getrocknet und in 50 μ l DEPC-behandeltem, deionisiertem Wasser resuspendiert.

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt, wobei 1 OD_{260} -Einheit einer Konzentration von 40 μ g/ml RNA entspricht.

3.2.12 Northern-Analyse

Für die Northern-Analyse wurden je 5 μ g der isolierten Gesamt-RNA über denaturierende, formaldehydhaltige 1,2%ige (w/v) Agarosegele elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert (Ausubel *et al.*, 1988). Der Kapillarblot erfolgte mit 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0) als Transferpuffer. Die transferierte RNA wurde durch Backen bei 80°C für 2 h auf der Nylonmembran nicht-kovalent fixiert. Durch Färben mit Methylenblau (0,04% (w/v) Methylenblau, 0,5 M Natriumacetat, pH 5,5) wurde sowohl der Transfer als auch die Qualität und Quantität der RNA, durch Visualisierung der 16S- und 23S-rRNA, kontrolliert.

Zum Nachweis bestimmter RNA-Fragmente wurden strangspezifische Digoxigenin-markierte RNA-Sonden verwendet, die mit Hilfe des T3/T7-Polymerase-Systems (MBI-Fermentas) und dem DIG RNA Labelling Mix (Roche Diagnostics, Mannheim) hergestellt wurden.

Herstellung strangspezifischer RNA-Sonden

mcE-Sonde

Zur Herstellung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde, die strangspezifisch mit dem Transkript des *mc-gvpE*-Leserahmens hybridisiert, wurde das Konstrukt mcE^{ex} (Röder, 1997) als Matrize verwendet. Nach Linearisierung des Plasmidkonstruktes durch hydrolytische Spaltung mit *Acc65I*, erfolgte die *in vitro*-Transkription der 240 bp RNA-Sonde mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase.

mcD-Sonde

Zur Herstellung der Digoxigenin-markierten, strangspezifischen RNA-Sonde, die mit dem Transkript des *mc-gvpD*-Leserahmens hybridisiert, wurde das Plasmidkonstrukt mcD^{ex} verwendet (Röder, 1997). Das Plasmidkonstrukt wurde durch hydrolytische Spaltung mit *XhoI* linearisiert und die 370 bp RNA-Sonde mittels *in vitro*-Transkription mit der T7-RNA-Polymerase synthetisiert.

mcA-Sonde

Die Herstellung der strangspezifischen RNA-Sonde, die mit dem *mc-gvpA*-Leserahmen hybridisiert, erfolgte mit Hilfe eines Konstruktes, das ein 367 bp *EcoRI-XcmI*-Fragment mit *mc-gvpA* in pBluescript II KS(+) enthält (Röder & Pfeifer, 1996) und der T3-RNA-Polymerase.

Die Hybridisierung der strangspezifischen RNA-Sonden mit der auf der Nylonmembran fixierten RNA erfolgte nach dem Protokoll von Ausubel *et al.* (1988). Die Blockierung der Membran fand für 2 h bei 42°C in Hybridisierungslösung statt, die abweichend vom Protokoll zusätzlich 10% (w/v) Dextransulfat, 1% SDS und 0,5% Magermilchpulver enthielt. Die Hybridisierung der RNA-Sonde erfolgte unter den gleichen Bedingungen über Nacht. Dann wurde die Membran mit 0,2x SSC, 0,1% SDS für jeweils 30 min bei 55°C, 60°C und 65°C gewaschen. Zur Detektion wurde das DIG Luminescent Detection Kit nach Angaben des Herstellers verwendet (Roche Diagnostics, Mannheim).

Northern-Analyse mit einer DNA-Sonde

Die Durchführung erfolgte analog einer Northern-Analyse mit einer RNA-Sonde mit folgenden Abweichungen:

Die Prähybridisierung und Hybridisierung wurde in DNA-Hybridisierungslösung (siehe Kapitel 3.2.10) durchgeführt. Die Denaturierung der DNA-Sonde erfolgte für 1 min bei 100°C. Nach der Hybridisierung wurde die Membran dreimal mit 0,2x SSC, 0,1% SDS bei 55°C gewaschen.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Bradford-Methode durchgeführt (Ausubel *et al.*, 1988). Hierfür wurden 20 µl einer Proteinlösung mit 980 µl Bradford-Reagenz (0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 4,75% (v/v) Ethanol, 8,5% (v/v) Phosphorsäure) versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur (ZT) inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Probe bei 595 nm bestimmt und anhand einer zuvor ermittelten Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) von 0,1 bis 1 mg/ml die Proteinkonzentration der Probe ermittelt.

3.3.2 Trichloressigsäure (TCA)-Fällung

Um die Fraktionen der Gelfiltrations-Chromatographie mittels SDS-PAGE oder Western-Analyse untersuchen zu können, musste deren Volumen stark eingeengt werden. Dazu wurden die Proteine denaturierend mit Trichloressigsäure (TCA) nach dem Protokoll von Porath *et al.* (1960) ausgefällt. Die Proteinlösung wurde im Verhältnis 5:1 mit 50%iger Trichloressigsäure versetzt, für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und 15 min bei 13.000 upm abzentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde in der Vakuum-Konzentrationszentrifuge getrocknet und anschließend in 1 M Tris-HCl pH 8,0 aufgenommen.

3.3.3 Analyse der BgaH-Aktivität (ONPG-Test)

Zur Ermittlung der BgaH-Aktivität (BgaH = halobakterielles Enzym mit β -Galaktosidaseaktivität aus *Hfx. lucentense* (Holmes & Dyll-Smith, 2000)) in *Hfx. volcanii* WFD11-Transformanten wurde der ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid)-Test entsprechend dem Protokoll von Holmes *et al.* (1997) verwendet. Die β -glykosidische Spaltung des verwendeten Substrates ONPG wird durch die BgaH katalysiert, wodurch ONP (ortho-Nitrophenolat) entsteht, dessen delokalisierte π -Elektronen Licht mit einer Wellenlänge von 405 nm absorbieren und zu einer Gelbfärbung führen. Die *Hfx. volcanii* WFD11-Transformanten wurden in 3 M *Hfx. volcanii* Vollmedium mit Mevinolin (6 µg/ml) und/oder Novobiocin (0,2 µg/ml) bei 37°C und 180 upm angezogen. Nach 54 h wurden 100 µl Probe entnommen und zur Lyse mit 50 µl 2% Triton X-100 versetzt. Anschließend wurden 800 µl ONPG-Testpuffer (2,5 M NaCl, 10 µM MnCl₂, 0,1% β -Mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 7,2) und 50 µl ONPG-Lösung (8 mg/ml ONPG in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,2) zugegeben, gemischt und für 5 min bei ZT inkubiert. Danach wurde die enzymatische Reaktion als Absorptionsänderung pro Zeiteinheit (dA/dt) für 5 min bei einer Wellenlänge von 405 nm

photometrisch verfolgt. Ausgehend vom Lambert-Beerschen Gesetz kann die Volumenaktivität als Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit in 1 ml berechnet werden.

Lambert-Beersches Gesetz:
$$\frac{dA}{dt} = \epsilon \cdot d \cdot \frac{dc}{dt}$$

A = Absorption
 c = Konzentration [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]
 d = Schichtdicke der Küvette [cm]
 ϵ = molarer Absorptionskoeffizient [$\text{l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$]

Der molare Extinktionskoeffizient ϵ für das Produkt ONP aus der β -glykosidischen Spaltung von ONPG beträgt bei 405 nm $3,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Eine Einheit (Unit) der β -Galaktosidaseaktivität ist definiert als die Enzymmenge, die die Hydrolyse von 1 μmol ONPG pro 1 min katalysiert. Durch die Proteinkonzentrationsbestimmung im Rohextrakt (siehe Bradford-Methode, Kapitel 3.3.1) kann die spezifische Aktivität in Units pro mg Gesamtprotein [U/mg] bestimmt werden.

3.3.4 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung erfolgte nach Edmann & Begg (1967) und wurde von Reinhard Mentele in der Arbeitsgruppe von Friedrich Lottspeich (MPI, Martinsried) durchgeführt.

3.3.5 Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die analytische Auftrennung von Proteinen wurden 12%ige SDS-Polyacrylamidgele nach Schagger (Schagger & von Jagow, 1987) verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit 3x SDS-Protein-Probenpuffer versetzt (0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerin, 4% SDS, 10% β -Mercaptoethanol, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8) und für 1-3 min bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung fand für 2-3 h bei 100 V statt.

3.3.6 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen

Coomassie-Färbung: Das Färben der Proteine nach Auftrennung in einem Polyacrylamidgel erfolgte mittels Inkubation mit Coomassie-Färbelösung (0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) Ethanol, 40% (v/v) Essigsäure, 10% (v/v) deionisiertes Wasser) für 15 min. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurden die Gele anschließend schüttelnd in Coomassie-Entfärber (8% Essigsäure, 25% Methanol, 67% deionisiertes Wasser) inkubiert.

Kolloidale Coomassie-Färbung: Die Proteine im Polyacrylamidgel wurden durch Inkubation in der Färbelösung (20% (v/v) Roti®-Blue (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 20% (v/v) Methanol, 60% (v/v) deionisiertes Wasser) über Nacht angefärbt. Das Entfärben des Hintergrundes erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit deionisiertem Wasser.

3.3.7 Blotten von Proteinen

3.3.7.1 Nachweis von Proteinen mittels Western-Analyse

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen wurden diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch das Nassblotverfahren nach Towbin *et al.* (1979) mit dem Midget Multiblot-System (Hoefer) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Der Transfer erfolgte für 2 h bei 300 mA und 4°C in 1x Western-Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% Methanol) und wurde durch Anfärben der transferierten Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit Ponceau-Rot-Lösung (0,2% (w/v) Ponceau-Rot S, 3% (w/v) Trichloressigsäure, 3% (w/v) Sulfosalicylsäure) kontrolliert. Um die Proteine anschließend immunologisch durch Anlagerung spezifischer Antikörper zu charakterisieren, wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei Zimmertemperatur in Blockierungslösung (1-2% Magermilch, 0,05-0,1% Tween20 in PBS-Puffer) inkubiert. Der PBS-Puffer enthielt 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4. Die spezifisch gegen halobakterielle Proteine generierten Antiseren aus Kaninchen wurden für 1 h bei Zimmertemperatur in einer Verdünnung von 1:1.000 oder 1:10.000 (cGvpE-Antiserum) in Blockierungslösung mit der Membran inkubiert. Durch dreimaliges Waschen für 10 min bei Zimmertemperatur mit 0,05-0,1% Tween20 in PBS-Puffer wurden unspezifisch reagierende Antikörper entfernt. Danach wurde die Membran für 1 h bei Zimmertemperatur mit einem Antikörper aus dem Esel (Amersham Pharmacia, UK) 1:5.000 verdünnt in Blockierungslösung inkubiert, der spezifisch mit IgG aus Kaninchen reagiert und mit Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Nach erneutem dreimaligen Waschen für 10 min mit 0,05-0,1% Tween20 in PBS-Puffer erfolgte die Immundetektion mit Hilfe des ECL-Systems (Amersham). Die Nitrozellulosemembran wurde für 1 min mit Chemilumineszenzlösung (Amersham Pharmacia, UK) inkubiert. Die Exposition des Röntgenfilms mit der Membran erfolgte in Zeitintervallen von 30 sec bis 15 min.

In dieser Arbeit verwendete Antiseren:

Antiserum	verwendet zur Detektion von	produziert in	Referenz
Anti-mcGvpD	mcGvpD	Kaninchen	Zimmermann & Pfeifer, 2003
Anti-mcGvpE	mcGvpE	Kaninchen	Zimmermann & Pfeifer, 2003
Anti-cGvpE	cGvpE	Kaninchen	nach Krüger & Pfeifer, 1996 neu generiert 2003

3.3.7.2 Semi-dry Blot

Für die N-terminale Sequenzierung eines unbekannten Proteins aus *Hfx. volcanii* wurde dieses mittels eines 12%igen SDS-Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des Semi-dry Blots (Kyhse-Andersen, 1984) auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte für 4 h bei 200 mA mit dem horizontalen Graphitplattensystem Multiphor II Novablot (LKB, Bromma, Schweden). Der Kathodenpuffer enthielt 0,3 M ϵ -Aminocapronsäure, 30 mM Tris-HCl, pH 6,5 und der Anodenpuffer enthielt 0,1 M Tricin, 0,3 M Tris-HCl, pH 8,75.

Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran für 5 sec mit 100% Methanol inkubiert und die transferierten Proteine anschließend für 1 min mit Färbelösung (0,1% Coomassie Blue R-250, 1% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol) angefärbt. Zum Entfärben der Membran diente 50% (v/v) Methanol in deionisiertem H₂O. Die PVDF-Membran wurde mit deionisiertem Wasser gewaschen und die entsprechende Proteinbande für die N-terminale Sequenzierung ausgeschnitten.

3.3.8 Isolierung und Reinigung von Proteinen

3.3.8.1 Isolierung von Proteinen aus *Hfx. volcanii* für Western-Analysen

Es wurden 15 ml einer exponentiell bzw. 6 ml einer stationär gewachsenen Kultur von *Hfx. volcanii*-Transformanten entnommen und sedimentiert. Die Zellen wurden in 400 μ l TE-Puffer mit 1 μ g/ml DNase I aufgenommen und für 30 min bei Zimmertemperatur zur Zelllyse inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysate über Nacht bei 4°C gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 dialysiert. Unlösliche Zellbestandteile und Zellmembranen wurden für 30 min bei 13.000 upm und 4°C sedimentiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate erfolgte mit der Bradford-Methode (Kapitel 3.3.1).

3.3.8.2 Isolierung von Proteinen aus *Hfx. volcanii* für *in vitro*-Studien

Hfx. volcanii-Transformanten, die verschiedene *gvp*-Gene unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors in pJAS35 exprimierten, wurden in 3 M *Hfx. volcanii* Vollmedium mit 0,2 μ g/ml Novobiocin bei 37°C und 180 upm bis zu einer OD₆₀₀ = 1,2-1,5 inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 ml der Kultur bei 4.000 upm und 4°C für 30 min sedimentiert. Für Interaktionsstudien wurde das Zellsediment in 5 ml Lysepuffer für *Hfx. volcanii* (2,5 M KCl, 50 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5% Glycerin, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert und mittels Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier 250) aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden bei 4.000 upm und 4°C für 20 min sedimentiert und die lösliche Proteinfraction des Zelllysates für Interaktionsstudien verwendet. Die Proteinkonzentration des Zelllysates wurde mit der Bradford-Methode (Kapitel 3.3.1) bestimmt.

3.3.8.3 Rekombinante Expression und Reinigung von Gvp_{his}-Proteinen aus *E. coli* M15

Die rekombinante Expression und Reinigung von Gvp_{his}-Proteinen aus *E. coli* M15 wurde wie von Peter Zimmermann beschrieben durchgeführt (Zimmermann & Pfeifer, 2003).

Verschiedene Gasvesikelproteine von *Hfx. mediterranei* und *Hbt. salinarum* PHH4 wurden als Fusionsproteine mit einem N-terminalen „Hexahistidin-tag“ (6xHis-tag) in *E. coli* M15 produziert. Die Gvp_{his}-Proteine wurden mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie über Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose) gereinigt. Zur rekombinanten Produktion der Gvp_{his}-Proteine wurden bereits vorliegende pQE8-Konstrukte verwendet. Der Expressionsvektor pQE8 (Qiagen) enthält am 5'-Ende seiner Klonierungsregion eine Sequenz, die für 6 Histidine kodiert, so dass die Inserierung der *gvp*-Leserahmen als *Bam*HI-*Hind*III-Fragmente zur Fusionierung dieser Sequenz mit dem *gvp*-Leserahmen führt.

Eine hohe Expressionsrate der 6xHis-tag-Fusionsproteine wird durch den T5-Promotor erzielt, der durch zwei *lac*-Operator-Sequenzen kontrolliert wird. *E. coli* M15 enthält das Repressorplasmid pREP4 (vermittelt Kanamycin-Resistenz) in geringer Kopienzahl, was zu einer konstitutiven Produktion des *lac*-Repressorproteins führt und eine vorzeitige Expression, der im pQE8-Vektor inserierten Leserahmen, verhindert. Die Expression, der im pQE8-Vektor (vermittelt Ampicillin-Resistenz) enthaltenen Genfusionen, kann gezielt durch die Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG) induziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete pQE8-Konstrukte:

mc- <i>gvpD</i> -pQE8	(Zimmermann & Pfeifer, 2003)	siehe Kapitel 3.2.6
mc- <i>gvpE</i> -pQE8	(Zimmermann & Pfeifer, 2003)	siehe Kapitel 3.2.6
c- <i>gvpE</i> -pQE8	(Krüger & Pfeifer, 1996)	siehe Kapitel 3.2.6

Zur rekombinanten Produktion der Gvp_{his}-Proteine wurde *E. coli* M15 mit den pQE8-Plasmidkonstrukten transformiert und in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml (LB Amp Kan) kultiviert. Die Transformanten wurden in LB Amp Kan über Nacht angezogen, 1:10 in LB Amp Kan verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ ≤ 0,6 bei 180 upm und 37°C inkubiert. Nach Induktion der Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Kultur für weitere 5 h schüttelnd inkubiert und die Zellen anschließend bei 4.000 upm und 4°C für 20 min sedimentiert.

Zur Reinigung der Gvp_{his}-Proteine wurde das Zellsediment einer 50 ml Kultur in 5 ml Lysepuffer (8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert und mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Zellmembranen und unlösliche Zellbestandteile wurden bei 4.000 upm und 4°C für 20 min von den löslichen Proteinen getrennt. Die Reinigung erfolgte im *batch*-Verfahren mit Hilfe der Metallchelate-

Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden). Jeweils 5 ml der löslichen Proteine wurden 20 min mit 1 ml Ni-NTA-Agarose inkubiert, die zuvor mit Lysepuffer äquiliert worden war. Anschließend wurde die Matrix bei 4.000 upm für 5 min sedimentiert und der Überstand entfernt. Durch viermaliges Waschen der Ni-NTA-Agarose für je 10 min mit 5 ml Waschpuffer (8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄, 10% Glycerin, 10 mM Tris-HCl, pH 5,0) wurden unspezifisch gebundene Proteine entfernt. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 2 ml Elutionspuffer (8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄, 500 mM Imidazol, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) und 20-minütige Inkubation. Es folgten zwei weitere Elutionsschritte mit je 1 ml Elutionspuffer. Der Reinheitsgrad der Elutionsfraktionen wurde mittels SDS-PAGE analysiert und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt.

Anschließend wurden die Proteine durch eine schrittweise Dialyse in ihre native Konformation überführt. Die Dialyse erfolgte bei 20°C für je 2 h in Puffern mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 sowie steigender Kaliumkonzentration und sinkender Harnstoffkonzentration (Puffer 1: 4 M Harnstoff, 0,8 M KCl; Puffer 2: 2 M Harnstoff, 1,6 M KCl; Puffer 3: 2,5 M KCl).

3.3.8.4 Native Expression und Reinigung von Gvp_{his}-Proteinen aus *Hfx. volcanii* WFD11

Die native Produktion und Reinigung von Gvp_{his}-Proteinen aus *Hfx. volcanii* erfolgte nach einem Protokoll von Peter Zimmermann (2004, unveröffentlicht), allerdings mit diversen Modifikationen.

Die Reinigung der nativ in *Hfx. volcanii* produzierten Gvp_{his}-Proteine wurde mit Hilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie (siehe Kapitel 3.3.8.3), jedoch unter nativen Bedingungen im Hochsalz durchgeführt. Die *his-gvp*-Leserahmen wurden unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im pJAS35 Vektor exprimiert.

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *his-gvp*-Fusionskonstrukte in pJAS35:

mcD _{his} ^{ex}	Zimmermann unveröffentlicht, 2003	siehe Kapitel 3.2.8
mcE _{his} ^{ex}	Zimmermann unveröffentlicht, 2003	siehe Kapitel 3.2.8
cE _{his} ^{ex}	Plöber, 1998	siehe Kapitel 3.2.8

Zur Herstellung der Gvp_{his}-Proteine wurde *Hfx. volcanii* WFD11 mit den pJAS35-Plasmidkonstrukten transformiert. Die WFD11-Transformanten wurde in 3 M *Hfx. volcanii* Vollmedium (VM) (siehe Kapitel 3.2.1) und 0,2 µg/ml Novobiocin angezogen. Vorkulturen der Transformanten wurden für 48 h inkubiert und zum Animpfen der Hauptkulturen mit einem Volumen von 500 ml 3 M *Hfx. volcanii* VM mit 0,2 µg/ml Novobiocin zu einer OD₆₀₀ = 0,02 verwendet. Die Hauptkulturen wurden bei 37°C und 180 upm bis zu einer OD₆₀₀ = 0,9-1,3 inkubiert und anschließend bei 4.000 upm und 4°C für 30 min sedimentiert.

Reinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie im *batch*-Verfahren

Für die Reinigung der Gvp_{his}-Proteine wurde das Zellsediment in 10 ml WFD11-Lysepuffer (2,5 M KCl, 10% (v/v) Glycerin, 0,2% (v/v) Triton X-100, 20 mM Imidazol, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert und nach Zugabe von 1 µg/ml DNase I mittels Ultraschall aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation von der löslichen Fraktion getrennt, die zu 2 ml Ni-NTA-Agarose (äquiliert in WFD11-Lysepuffer) gegeben und für 20 min mit dieser inkubiert wurde. Dann erfolgten vier Waschschrte mit je 10 ml Waschpuffer (2,5 M KCl, 10% Glycerin, 20 mM Imidazol, 50 mM Na₂HPO₄, pH 6,0). Die Elution wurde in drei aufeinander folgenden Schritten mit Elutionspuffer (2,5 M KCl, 10% Glycerin, 0,5 M Imidazol, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) für je 20 min durchgeführt. Die erste Elution erfolgte mit 2 ml, die beiden darauf folgenden Elutionen mit 1 ml Elutionspuffer.

Die Kaliumchloridkonzentration in den Reinigungspuffern wurde zwischen 1 M KCl und 2,5 M KCl variiert.

FPLC-basierte Reinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Um größere Proteinmengen zu reinigen wurde eine Ni-NTA-Agarose-Säule ($V_s = 10$ ml) (Qiagen, Hilden), die mit einer FPLC-Apparatur (Amersham Pharmacia, Freiburg) verbunden war, verwendet. Zum Erhalt einer großen Zellmasse der *Hfx. volcanii*-Transformanten, wurden diese in einem 15 l Fermenter in 3 M *Hfx. volcanii* Vollmedium mit 0,2 µg/ml Novobiocin bei 37°C auf einem Magnetrührer bei 330 upm unter Belüftung angezogen. Die Zellernte erfolgte bei einer $OD_{600} = 0,7$. Das Zellsediment aus 7 l Kultur wurde in 140 ml WFD11-Lysepuffer mittels Ultraschall aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde für 15 min bei 10.000 upm (GSA, Sorvall) und anschließend für 45 min bei 25.000 upm (45Ti, Beckmann) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die in WFD11-Lysepuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen und die Säule mit 60 ml Waschpuffer gespült. Die Elution erfolgte mit 30 ml Elutionspuffer und wurde in je 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Zusammensetzung der Puffer entsprach den für die *batch*-Reinigung verwendeten Puffern, allerdings betrug die Kaliumchloridkonzentration in allen Puffern nur 1,5 M KCl.

3.3.8.5 Rekombinante Expression und Reinigung von *Strep*-Gvp-Proteinen aus *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

Zur Produktion verschiedener Gvp-Proteine aus *Hfx. mediterranei* und *Hbt. salinarum* PHH4 als Fusionsproteine mit einem N-terminalen *Strep-tag* II wurde der Expressionsvektor pPR-IBA2 (IBA, Göttingen) verwendet.

Der Expressionsvektor pPR-IBA2 wurde durch hydrolytische Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *Sma*I und *Nar*I, Glätten des durch *Nar*I erzeugten 3'-überhängenden Endes mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase und anschließende Religation der

glatten Enden so modifiziert, dass *gvp*-Leserahmen mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Hind*III im Leseraster zum *Strep-tag* II inseriert werden können. Der so modifizierte Vektor wurde als pPR-IBA2* bezeichnet (Abb. 4).

*Xba*I

TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT**ATG**GCTAGCTGGAGCCACCCGCAGTTC
 RBS Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe
 Link *Strep-tag* II

BamHI *Xho*I *Sal*I *Pst*I *Nco*I *Eco*RV **Hind**III
 GAAAAAGGCgGGGGATCCCTCGAGTCGACCTGCAGGGGGACCATGGTCTCTGATATCTAACTAAGCTT
 Glu Lys Gly Gly Gly Ser

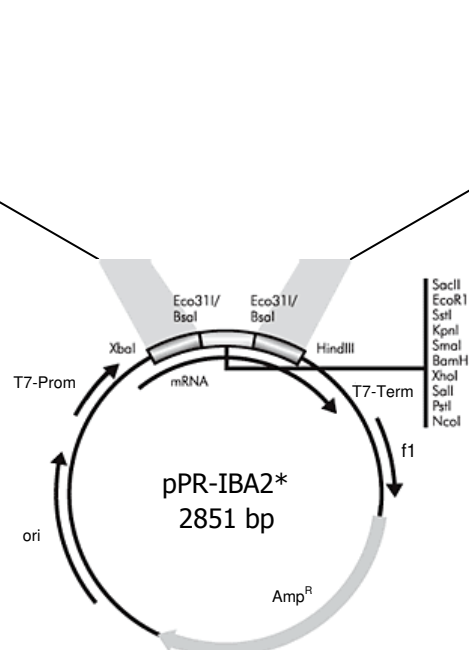


Abb. 4: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pPR-IBA2* (IBA, Göttingen). Amp = Ampicillin-Resistenz, T7-Prom = T7-Promotor, MCS = multiple Klonierungsregion, ori = Replikationsursprung, T7-Term = Transkriptionsterminator des Lipoprotein-Gens, f1 = f1-Replikationsursprung. Die Sequenz der modifizierten Klonierungsregion des pPR-IBA2* Expressionsvektors ist im oberen Teil detailliert abgebildet (dargestellte Sequenz Pos. 558-697). RBS = Ribosomenbindungsstelle

Eine hohe Expressionsrate der in pPR-IBA2 inserierten Leserahmen wird durch den T7-Promotor erzielt, so dass die Expression in *E. coli*-Stämmen erfolgen muss, die eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerasegens enthalten. *E. coli* BL21(DE3)-Zellen besitzen das T7-RNA-Polymerasegen, welches durch DE3-Bakteriophagen in das chromosomale Genom integriert wurde (Studier & Moffat, 1986; Novy & Morris, 2001). In *E. coli* BL21 (DE3) liegt das T7-RNA-Polymerasegen unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors vor, der durch Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) induziert werden kann. Der pPR-IBA2-Vektor vermittelt Ampicillin-Resistenz. In BL21 (DE3) pLysS-Zellen führt die Expression des T7-Lysozymgens, das im pLysS-Vektor vorhanden ist, zur Produktion des T7-Lysozyms. Das

T7-Lysozym ist ein natürlicher Inhibitor der T7-RNA-Polymerase und verhindert so eine basale Expression ausgehend vom T7-Promotor.

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete pPR-IBA2*-Konstrukte:

mc- <i>gvpE</i> -pPR-IBA2*	siehe Kapitel 3.2.6
mc- <i>gvpD</i> -pPR-IBA2*	siehe Kapitel 3.2.6
mc- <i>gvpD</i> _{Mut6} -pPR-IBA2*	siehe Kapitel 3.2.6
c- <i>gvpE</i> -pPR-IBA2*	siehe Kapitel 3.2.6

Zur Herstellung der *Strep*-Gvp-Proteine wurden *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen verwendet. Das pLysS-Plasmides vermittelt Chloramphenicol-Resistenz. Zur Selektion der Transformanten wurden Festmedien mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 mg/ml Chloramphenicol benutzt. Bei der anschließenden Inkubation im Flüssigmedium wurde auf eine Zugabe von Chloramphenicol verzichtet, was jedoch meist nicht zu einem Verlust des pLysS-Plasmides führte.

Zur Überproduktion der *Strep*-Gvp-Proteine wurden zunächst 5 ml Übernachtskulturen der *E. coli* BL21(DE3) pLysS-Transformanten in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37°C und 180 upm angezogen. Die Hauptkulturen mit einem Volumen von 50 ml LB mit 20 µg/ml Ampicillin wurden mit den Vorkulturen zu einer OD₅₅₀ = 0,08 angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀ ≤ 0,6 bei 37°C und 200 upm inkubiert. Um eine gute Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, sollte die Inkubation dieses Kulturvolumens in einem 250 ml Erlenmeyerkolben erfolgen. Nach der Induktion der *Strep*-Gvp-Proteinproduktion mit 1 mM IPTG wurden die Kulturen für weitere 5 h bei 37°C und 200 upm inkubiert und anschließend bei 4.000 upm und 4°C für 20 min sedimentiert.

Die Anzucht von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS erfolgte außer in LB-Medium (Sambrook & Russell, 2001) auch in NZCYM-, 2 x YT- oder TB-Medium (Sambrook & Russell, 2001).

Strep-Gvp-Proteine wurden mittels *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie (IBA, Göttingen) gereinigt. Die Bindung von Biotin (Vitamin H) und Avidin (oder Streptavidin aus *Streptomyces avidinii*) ist eine der hochaffinsten natürlichen Bindungen. Das *Strep-tag*/*Strep*-Tactin System basiert auf dieser Grundlage und wurde von der Firma IBA (Göttingen) entwickelt. Bei *Strep*-Tactin handelt es sich um ein rekombinantes Minimal-Streptavidin, das eine optimierte Erkennung des *Strep-tag* II aufweist.

Das Zellsediment einer 50 ml *E. coli* BL21(DE3) pLysS-Expressionskultur wurde in 5 ml denaturierendem Lysepuffer (8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschallbehandlung (Branson Sonifier 250) aufgeschlossen. Die Trennung der löslichen Proteine von den Zellmembranen und anderen

unlöslichen Zellbestandteilen erfolgte durch Zentrifugation (4.000 upm und 4°C für 20 min). Um einen Teil der *E. coli*-Proteine bereits vor der Reinigung vom halophilen *Strep*-Gvp-Protein zu trennen, wurde das Zelllysate schrittweise dialysiert. Die Dialyse erfolgte in drei aufeinanderfolgenden Schritten, um den Harnstoff komplett zu entfernen und die Proteine in eine Lösung mit 2,5 M KCl zu bringen. Für die Dialyse wurden folgende Puffer verwendet: Dialysepuffer 1 (4 M Harnstoff, 0,8 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2), Dialysepuffer 2 (2 M Harnstoff, 1,6 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2) und Dialysepuffer 3 (2,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2). Anschließend wurde die Proteinlösung für 10 min bei 13.000 upm abzentrifugiert, um ausgefallene Proteine zu sedimentieren. Bei hoher Ionenstärke antichaotroper Salze sinkt die Löslichkeit von Proteinen (Aussalz-Effekt), was jedoch nicht für halophile Proteine zutrifft, die sogar eine hohe Salzkonzentration für ihre native Konformation und Funktionalität benötigen (Grant & Larsen, 1989; Kushner, 1985). Demzufolge sollte ein Großteil der *E. coli*-Proteine nach der Dialyse nicht mehr in löslicher Form vorliegen.

Unmittelbar vor *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie wurde die Proteinlösung erneut für 45 min bei 15.000 upm und 4°C abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand auf eine 1 ml *Strep*-Tactin-Säule gegeben, die zuvor mit 2 Säulenvolumina (SV) Puffer W (2,5 M KCl, 10% Glycerin, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0) äquilibriert wurde. Anschließend erfolgten fünf Waschschritte mit je 1 SV Puffer W. Die Elution erfolgte sechsmal mit je 0,5 SV Puffer E (2,5 mM Desthiobiotin, 2,5 M KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0). Die Reinigung wurde bei 4°C durchgeführt.

Streptavidin besitzt vier hochaffine Bindestellen für seinen natürlichen Liganden Biotin, der in dieselbe Tasche des Streptavidins bindet wie der *Strep-tag* II. D-Desthiobiotin ist ein oxidationsunempfindliches Derivat von D-Biotin, welches im Gegensatz zu Biotin reversibel an *Strep*-Tactin bindet und somit das *Strep*-Gvp-Protein kompetitiv verdrängt.

3.3.9 Protein-Protein-Interaktionsstudien

3.3.9.1 Affinitätschromatographie mit gebundenen Gvp_{his}-Proteinen und halobakteriellen Lysaten

Die Affinitätschromatographien zum Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion wurden wie bereits durch Peter Zimmermann beschrieben mit einigen Modifikationen durchgeführt (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Die rekombinant in *E. coli* M15 produzierten und durch Dialyse in 2,5 M KCl rückgefalteten Gvp_{his}-Proteine wurden für die Interaktionsexperimente verwendet. Um eine Gvp_{his}-beladene Affinitätschromatographiematrix herzustellen, wurden 100 µl Ni-NTA-Agarose (äquilibriert in 2,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2) mit 400 µg rückgefaltetem Gvp_{his}-Protein für 1 h inkubiert. Pufferwechsel erfolgten jeweils durch Sedimentieren der Matrix bei 13.000 upm für 3 min und Entfernen des Überstandes.

Anschließend wurde die beladene Gvp_{his}-Matrix zweimal mit 1 ml Waschpuffer 1 (2,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2) gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Die Gvp_{his}-beladene Matrix wurde für 30 min mit 2 mg der löslichen Fraktion des Gesamtproteingehalts einer *Hfx. volcanii*-Transformanten inkubiert, die den Leserahmen des putativen Interaktionspartners unter der Kontrolle des P_{fdx} -Promotors in pJAS35 exprimiert. Die Isolierung der löslichen Proteine erfolgte in der stationären Wachstumsphase der *Hfx. volcanii*-Transformanten (siehe Kapitel 3.3.8.2). Dann wurde die Matrix viermal für 10 min mit 1 ml Waschpuffer 2 (Waschpuffer 1 + 50 mM Imidazol) gewaschen. Die Zugabe von Imidazol zum Waschpuffer war notwendig, um eine unspezifische Bindung des putativen Interaktionspartners an die Matrix zu vermeiden. Als Kontrolle erfolgte ein weiterer Waschschriff mit 100 µl Waschpuffer 2. Die Elution des Gvp_{his}-Proteins zusammen mit interagierenden Proteinen erfolgte durch zweimalige Inkubation mit 100 µl Elutionspuffer (0,5 M Imidazol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2) für 20 min. Jeweils 10 µl des letzten Waschschriffes und 10 µl der beiden Elutionsfraktionen wurden für Western-Analysen eingesetzt.

3.3.9.2 Affinitätschromatographie mit gebundenen Gvp_{his}-Proteinen und *Strep*-Gvp-Proteinen

Die Affinitätschromatographie mit zwei gereinigten, möglichen Protein-Interaktionspartnern wurde in Anlehnung zur Affinitätschromatographie mit einem Gvp_{his}-Protein und einem halobakteriellen Zelllysate durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.9.1).

Um eine Gvp_{his}-beladene Affinitätschromatographiematrix herzustellen, wurden 100 µl Ni-NTA-Agarose (äquiliert in 2,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) mit 400 µg Gvp_{his}-Protein für 1 h inkubiert. Pufferwechsel erfolgten jeweils durch Sedimentieren der Matrix bei 13.000 upm für 3 min und Entfernen des Überstandes. Anschließend wurde die beladene Gvp_{his}-Matrix zweimal mit 1 ml Waschpuffer 1 gewaschen (2,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) um ungebundenes Protein zu entfernen. Die Gvp_{his}-beladene Matrix wurde für 30 min mit 100 µg eines *Strep*-Gvp-Proteins oder mit 100 µg *Strep*-Gvp-Protein und 1 mg der löslichen Proteine eines *Hfx. volcanii* WFD11-Lysates inkubiert. Danach wurde die Matrix fünfmal für 10 min mit 1 ml Waschpuffer 2* (2,5 M KCl, 20 mM Imidazol, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) gewaschen. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschriffe mit je 100 µl Waschpuffer 2*. Die Elution des Gvp_{his}-Proteins mit möglichen assoziierten Proteinen geschah durch zweimalige Inkubation für 20 min mit 100 µl Elutionspuffer (500 mM Imidazol, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0). Je 10 µl des letzten Waschschriffes und der beiden Elutionsfraktionen wurden für Western-Analysen eingesetzt.

3.3.10 Methoden zur Untersuchung der Quartärstruktur von Proteinen

3.3.10.1 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die native Polyacrylamidgelelektrophorese kann verwendet werden, um Proteine ohne Zerstörung ihres oligomeren Zustandes anhand ihrer Größe, Form und Ladung aufzutrennen. Zur Untersuchung der quartären Struktur des mcGvpD-Proteins wurde eine native Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Es wurden 6%ige Polyacrylamidgele (9x 10 cm) nach Schägger & von Jagow (1987) verwendet, die jedoch kein SDS enthielten und ausschließlich aus einem Trenngel bestanden. Alle verwendeten Gel- und Laufpuffer entsprachen in ihrer Zusammensetzung dem Protokoll nach Schägger & von Jagow (1987), allerdings ohne SDS. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit 10x Probenauftragspuffer (50% Glycerin, 0,2% Bromphenolblau, 100 mM Tris-Bis, pH 7,0) versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 5 h bei 70 V oder für 3-4 h bei 100 V. Als Standardproteine wurden β -Galaktosidase, α_2 -Makroglobulin, BSA (Roche Diagnostics, Mannheim) und β -Amylase, Thyroglobulin (Sigma) verwendet.

3.3.10.2 Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltration (= Gelpermeations-Chromatographie) können Moleküle nach ihrer Größe und Form getrennt werden. Die Trennung der Moleküle basiert auf der unterschiedlichen Permeation derselben in ein poröses Trägermaterial mit definierter Porengröße (stationäre Phase). Kleinere Moleküle können in die Poren der stationären Phase eindringen und werden aufgrund ihres unterschiedlichen Diffusionsverhaltens unterschiedlich lang retardiert, wohingegen größere Moleküle entsprechend früher eluieren. Moleküle ab einer gewissen Größe können nicht mehr in die Poren des Trägermaterials eindringen und eluieren zusammen mit der Lösungsmittelfront im Ausschlussvolumen (V_0). Da über einen großen Molekulargewichtsbereich eine lineare Beziehung zwischen dem Elutionsvolumen (V_e) eines Moleküls und dem dekadischen Logarithmus seiner molaren Masse besteht, kann durch die Erstellung einer Eichgeraden mit Proteinen bekannter molarer Masse die molare Masse eines unbekannten Moleküls ermittelt werden. Die Wahl des verwendeten Trägermaterials richtet sich nach der Größe der zu trennenden Moleküle. Um ein möglichst breites Fraktionierungsspektrum abzudecken, wurde hier Superose 6 *prep grade* (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) verwendet, dessen Fraktionierungsspektrum im Bereich von 5 kDa bis 5000 kDa liegt.

Die Bestimmung der nativen Molekülmasse des mcGvpD-Proteins (mcGvpE und cGvpE wurden als Kontrollen verwendet) erfolgte mittels chromatographischer Auftrennung über eine Superose 6 HR 10/30 Gelfiltrations-Säule (GE Healthcare). Die Kalibrierung der Säule fand mit Hilfe der folgenden Standardproteine statt: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440

kDa), β -Amylase (200 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa), Karbonatanhydrase (29 kDa) und Cytochrom C (12 kDa) (Sigma). Zur Kalibrierung wurde die Säule in 1,5 M KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 (HSP) äquilibriert. Die Standardproteine wurden ebenfalls in Äquilibrierungspuffer gelöst.

Das mcGvpD Protein wurde als His-Gvp-Protein rekombinant in *E. coli* M15 produziert, mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt, durch Dialyse in 1,25 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 und anschließendes Einengen des Puffervolumens in 2,5 M KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,2 rückgefaltet. 200 μl mcGvpD_{his} (450 $\mu\text{g/ml}$) wurden mit Hilfe einer Injektionsschleife auf die in HSP äquilibrierte Gelfiltrations-Säule gegeben. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Analog wurden auch mcGvpE_{his} (250 $\mu\text{g/ml}$) und cGvpE_{his} (326 $\mu\text{g/ml}$) einer Gelfiltrations-Analyse unterzogen. Die Proteine wurden nach der denaturierenden Reinigung aus *E. coli* in einen Hochsalzpuffer (2,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2) dialysiert. Im Falle der beiden GvpE Proteine wurden je 1 ml Fraktionen gesammelt, mit TCA gefällt und mittels Gelelektrophorese untersucht.

Zur Analyse des denaturierten mcGvpD_{his}-Proteins wurde die Gelfiltrations-Säule in 8 M Harnstoff, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 äquilibriert, und 200 μl mcGvpD_{his}-Protein (540 $\mu\text{g/ml}$) im gleichen Puffer wurden mit Hilfe einer Injektionsschleife auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Entsprechend wurden auch 500 μl von mcGvpE_{his} (423 $\mu\text{g/ml}$) und cGvpE_{his} (1,31 mg/ml) analysiert. Die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt, TCA gefällt und mittels Gelelektrophorese analysiert.

Über eine in 1,5 M KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 äquilibrierte Gelfiltrations-Säule wurden 500 μl des nativ in *Hfx. volcanii* WFD11 hergestellten mcGvpD_{his}-Proteins (82 $\mu\text{g/ml}$) aufgetrennt, welches in 2,5 M KCl, 0,5 M Imidazol, 10% Glycerin, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 vorlag. Die Flussrate betrug 1 ml/min und es wurden je 1 ml Fraktionen gesammelt, TCA gefällt und mittels Western-Analyse untersucht. Analog wurden auch 500 μl mcGvpE_{his} (137 $\mu\text{g/ml}$) und cGvpE_{his} (156 $\mu\text{g/ml}$) aus *Hfx. volcanii* WFD11 chromatographisch aufgetrennt und die erhaltenen Fraktionen anschließend analysiert. Ebenso wurde mit dem PitA Protein aus *Hfx. volcanii* WFD11 (120 $\mu\text{g/ml}$) verfahren.

3.3.10.3 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Mit Hilfe der Ultrazentrifugation in einem Saccharose-Dichtegradienten können Makromoleküle anhand ihrer molaren Masse aufgetrennt werden. Diese Methode wurde verwendet, um mcGvpD_{his} (gereinigt aus *Hfx. volcanii* WFD11) von PitA zu trennen.

Für die Ultrazentrifugation wurden kontinuierliche Saccharose-Dichtegradienten (12 ml, 10%-25% oder 25-40%) hergestellt. Zusätzlich zur Saccharose enthielten die Lösungen zur Herstellung des Dichtegradienten 1,5 M KCl, 10% Glycerin und 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. Die

Proteine, die untersucht werden sollten, lagen in einer Lösung mit 1,5 M KCl, 10% Glycerin, 0,5 M Imidazol und 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 vor, was die Zugabe der entsprechenden Salzkonzentration und Glycerinmenge zu den Saccharoselösungen erforderte, um die Dichteverhältnisse anzugleichen.

Auf die Saccharose-Gradienten wurden 800 µl Proteinlösung gegeben. Die Zentrifugation der Saccharose-Gradienten erfolgte für 20 h bei 41.000 upm und 4°C (Beckmann, SW41 Ti). Anschließend wurden von oben (Fraktion 1) nach unten (Fraktion 12) 1 ml Fraktionen des Gradienten abgenommen und der Boden des Röhrchens mit 1 ml 25%iger Saccharoselösung gespült (Fraktion 13). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western-Analyse untersucht und die enthaltenen Proteinmengen mit Hilfe der Bradford-Methode ermittelt.

Zum Vergleich wurde auch Thyroglobulin (Sigma) in einem 10-25% und 25-40% Saccharose-Dichtegradienten mit 1,5 M KCl, 10% Glycerin und 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 sedimentiert.

4. Ergebnisse

Die beiden regulatorischen Proteine GvpD (Repressor) und GvpE (Transkriptionsaktivator) sind an der Regulation der Gasvesikelbildung beteiligt. Sie können miteinander interagieren und die Gegenwart von mcGvpD scheint zu einer Reduktion der mcGvpE-Proteinmenge zu führen (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktionsweise des GvpD-GvpE-Regulationssystems näher untersucht. Die Analysen können thematisch in die folgenden drei Teilbereiche untergliedert werden:

1. Untersuchung der Interaktionsfähigkeit verschiedener mcGvpD-Deletionsmutanten mit mcGvpE. Diese Analysen wurden durchgeführt, um den Interaktionsbereich in mcGvpD genauer zu lokalisieren.
2. *In vivo*-Studien zur mcGvpD-induzierten Reduktion der GvpE-Proteinmenge. Für diese Funktion wichtige Sequenzmotive in mcGvpD sollten hier durch die Untersuchung verschiedener mcGvpD-Mutanten identifiziert werden. Weiterhin wurde die Bedeutung verschiedener, konservierter Aspartatreste des cGvpE-Proteins für die Stabilität von cGvpE in Gegenwart von mcGvpD getestet.
3. Untersuchungen zur Quartärstruktur von mcGvpD.

4.1 Untersuchung der Interaktionsfähigkeit verschiedener mcGvpD-Deletionsmutanten mit mcGvpE

Die Analyse der Interaktionsfähigkeit bereits vorhandener Substitutionsmutanten von mcGvpD (Pfeifer *et al.*, 2001) ergab bislang keinen eindeutigen Hinweis auf den Bereich des Proteins, der für die Interaktion mit mcGvpE verantwortlich ist (Scheuch, 2003). Die untersuchten mcGvpD-Mutanten enthielten Substitutionen im Bereich des *p-loop*-Motivs und der basischen Region 1 und 2, die zu einem Verlust ihrer Fähigkeit zur Reprimierung der Gasvesikelbildung führten (Pfeifer *et al.*, 2001). Für alle getesteten mcGvpD-Mutanten konnte eine Interaktion mit mcGvpE gezeigt werden, lediglich die Deletionsmutante Nterm362 (ohne C-terminale Domäne) hatte ihre Interaktionsfähigkeit verloren (Scheuch, 2003). Um den Bereich der Interaktion mit mcGvpE näher einzugrenzen, wurden verschiedene mcGvpD-Deletionsmutanten hergestellt und auf ihre Interaktionsfähigkeit mit mcGvpE hin untersucht.

4.1.1 Herstellung von mcGvpD-Deletionsmutanten und Untersuchung ihrer repressorischen Funktion

Die verschiedenen D_{Mut}^{ex} -Konstrukte mit unterschiedlich großen Deletionen im *mc-gvpD*-Leserahmen wurden wie folgt erhalten: Die Deletionen im *mc-gvpD*-Leserahmen in den Plasmidkonstrukten $D_{\Delta p-loop}^{ex}$ und $D_{\Delta G-L}^{ex}$ wurden mittels rekombinanter PCR erzeugt. Die Deletionen im C-terminalen Bereich (Nterm-Konstrukte) wurden jeweils durch Einfügen eines Stopcodons an den gewünschten Positionen erzielt, wohingegen verschieden große Deletionen im N-terminalen Bereich (Cterm-Konstrukte) durch Deletion des ursprünglichen und Einfügen eines neuen Startcodons an der gewünschten Position erfolgten. Die mittels PCR amplifizierten Leserahmen wurden als *NcoI*-*Acc65I*-Fragmente in den Expressionsvektor pJAS35 inseriert. Die erhaltenen Plasmidkonstrukte wurden jeweils durch DNA-Sequenzanalyse auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Die mcGvpD-Varianten sind in Tabelle 3 beschrieben in Abb. 5 schematisch dargestellt.

Tabelle 3. Verschiedene mcGvpD-Deletionsmutanten.

mcGvpD Deletionsmutanten im Bereich des <i>p-loop</i> -Motivs	
$\Delta p-loop$	Deletion des <i>p-loop</i> -Motivs (AS 39 bis 46)
$\Delta G-L$	Deletion N-terminal des <i>p-loop</i> -Motivs (AS 32 bis 35)
mcGvpD-Deletionsmutanten mit unterschiedlich großen Deletionen des C-Terminus	
Nterm318	enthält die ersten 318 AS (36 kDa)
Nterm362	enthält die ersten 362 AS bis zum unkonservierten Bereich von mcGvpD (41 kDa) (Scheuch, 2003)
Nterm426	enthält die ersten 426 AS mit dem unkonservierten Bereich von mcGvpD (47 kDa)
Nterm447	enthält die ersten 447 AS mit dem unkonservierten Bereich + 21 AS (50 kDa)
Nterm502	enthält die ersten 502 AS des GvpD Proteins mit dem unkonservierten Bereich und der basischen Region 2 (56 kDa)
mcGvpD-Deletionsmutanten mit unterschiedlich großen Deletionen des N-Terminus	
Cterm356	enthält die letzten 356 AS, die ersten 189 AS des N-Terminus sind deletiert (39 kDa)
Cterm233	enthält die letzten 233 AS, die ersten 312 AS des N-Terminus sind deletiert (26 kDa)
Cterm119	enthält die letzten 119 AS, die ersten 426 AS des N-Terminus sind deletiert (26 kDa) (Scheuch, 2003)

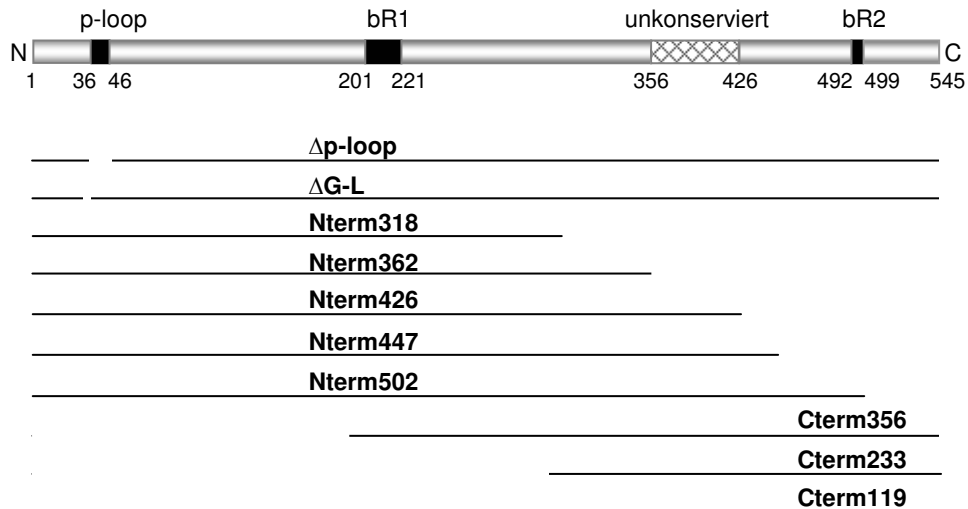


Abb. 5: Schematische Darstellung des mcGvpD-Proteins (oben) und der verschiedenen mcGvpD-Deletionsmutanten. Das *p-loop*-Motiv, die basischen Regionen bR1 und bR2 sowie der unkonserverte Bereich sind mit Angabe ihrer Position in der Aminosäuresequenz von mcGvpD gekennzeichnet. Die Mutanten Nterm426 und Cterm119 wurden bereits in meiner Diplomarbeit (Scheuch, 2003) hergestellt.

Die Fähigkeit der verschiedenen mcGvpD-Deletionsmutanten zur Repression der Gasvesikelbildung wurde untersucht. Eine Gasvesikelproduktion von *Hfx. volcanii*-Transformanten kann anhand des Phänotyps von Kolonien auf Festmedien leicht sichtbar gemacht werden (Abb. 6). Der Gasvesikel-negative (Vac^-) *Hfx. volcanii* WFD11 bildet rote, durchsichtige Kolonien. *Hfx. volcanii*-Transformanten, die die mc-vac Region enthalten, bringen aufgrund der Gasvesikelproduktion (Vac^+) rosa, trübe Kolonien hervor. ΔD -Transformanten, die die mc-vac mit einer internen 918 bp Deletion im mc-*gvpD* Leserahmen enthalten, weisen dagegen einen weißlich-rosa und opaken Phänotyp auf, der auf eine Überproduktion von Gasvesikeln (Vac^{++}) zurückzuführen ist. Enthalten *Hfx. volcanii*-Transformanten zusätzlich zu ΔD den mc-*gvpD*-Leserahmen unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors im Expressionsvektor pJAS35, so bilden sie rote, durchsichtige Kolonien aus. Dies zeigt die Fähigkeit von GvpD zur Reprimierung der Gasvesikelbildung (Pfeifer *et al.*, 2001).

Um die repressorische Funktion der mcGvpD-Deletionsmutanten zu untersuchen, wurden deshalb *Hfx. volcanii*-Doppeltransformanten hergestellt, die zusätzlich zu ΔD den jeweiligen mc-*gvpD*_{Del}-Leserahmen unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors in pJAS35 enthielten. Der Phänotyp der $\Delta D + D_{Del}^{ex}$ -Transformanten war in allen Fällen weißlich-rosa und opaque, zeigte also eine Gasvesikelüberproduktion an (Abb. 6). Somit haben die verschiedenen mcGvpD-Deletionsmutanten ihre Fähigkeit zur Reprimierung der Gasvesikelbildung verloren.

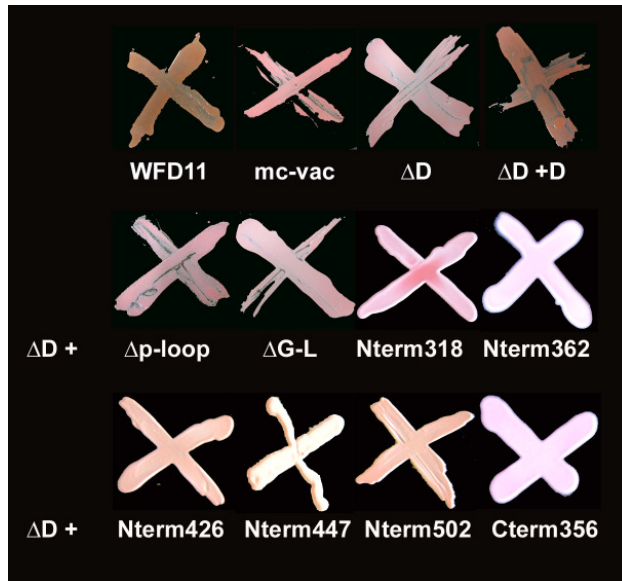


Abb. 6: Vac-Phänotypen von *Hfx. volcanii*-Transformanten auf Agarplatten (einzelne Transformanten stammen von verschiedenen Festmedien). Im oberen Abschnitt ist der Phänotyp des Gasvesikel-negativen (Vac⁻) *Hfx. volcanii* WFD11 (rot, durchsichtig), einer Gasvesikel-produzierenden (Vac⁺) mc-vac-*Hfx. volcanii*-Transformanten (rosa, trüb), einer Gasvesikel-überproduzierenden (Vac⁺⁺) ΔD -Transformante (weißlich, opaque) sowie einer $\Delta D + D^{\text{ex}}$ -Transformanten (Vac⁻) zu sehen. Die Phänotypen der verschiedenen $\Delta D + D_{\text{Del}}^{\text{ex}}$ -Transformanten (Vac⁺⁺) sind in der Mitte und im unteren Abschnitt der Abbildung dargestellt.

Eine Analyse der Deletionsmutanten Cterm233 und Cterm119 war nicht möglich. Diese beiden kleinsten C-terminalen mcGvpD-Varianten konnten mit Hilfe von Western-Analysen fast nicht (Cterm233) oder gar nicht (Cterm119) in *Hfx. volcanii*-Transformanten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), was andeutete, dass sie entweder in zu geringer Menge gebildet wurden, instabil waren oder mit Hilfe des mcGvpD-Antiserums nicht nachgewiesen werden konnten. Somit konnten die Deletionsvarianten Cterm233 und Cterm119 für weitere Analysen nicht verwendet werden.

Die Gasvesikelüberproduktion bedingt durch das Fehlen einer Reprimierung der P_{mcA} -Promotoraktivität kann auch auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. In ΔD -Transformanten können vor allem während der stationären Wachstumsphase große Mengen des mc-*gvpA*-Transkripts detektiert werden (Pfeifer *et al.*, 2001). In $\Delta D + D^{\text{ex}}$ -Transformanten ist die Menge des mc-*gvpA*-Transkripts dagegen deutlich reduziert (Pfeifer *et al.*, 2001). In den verschiedenen, hier konstruierten $\Delta D + D_{\text{Del}}^{\text{ex}}$ -Transformanten wurden vor allem während der stationären Wachstumsphase große Mengen des mc-*gvpA*-Transkriptes nachgewiesen (Abb. 7). Infolgedessen wurde die fehlende repressorische Aktivität der mcGvpD-Deletionsmutanten auch mit Hilfe der Northern-Analyse bestätigt. Im Fall von Nterm362 und Cterm356 waren die mc-*gvpA*-Transkriptmengen allerdings nicht so stark erhöht wie bei den anderen untersuchten mcGvpD-Deletionsmutanten, was andeutet, dass ihre repressorische Funktion zwar reduziert, aber nicht vollkommen verloren gegangen ist. Die Ergebnisse der Untersuchung der repressorischen Funktion der mcGvpD-Deletionsmutanten sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Um sicherzustellen, dass die fehlende repressorische Funktion der verschiedenen mcGvpD-Deletionsmutanten nicht auf ein Fehlen der mcGvpD_{Del}-Proteine in den WFD11-Transformanten zurückzuführen war, wurde die lösliche Fraktion der Gesamtproteine dieser Transformanten mittels Western-Analyse untersucht. Proben für die Analyse wurden jeweils

in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase entnommen. Die Western-Analysen zeigten deutlich, dass in allen $\Delta D + D_{\text{Del}}^{\text{ex}}$ -Transformanten das mcGvpD-Protein oder die jeweilige mcGvpD-Deletionsmutante produziert wurde (Abb. 8). Somit ist die fehlende Reprimierung der Gasvesikelbildung auf den Verlust der repressorischen Aktivität der mutierten mcGvpD-Proteine und nicht auf das Fehlen der jeweiligen Proteine in den Transformanten zurückzuführen.

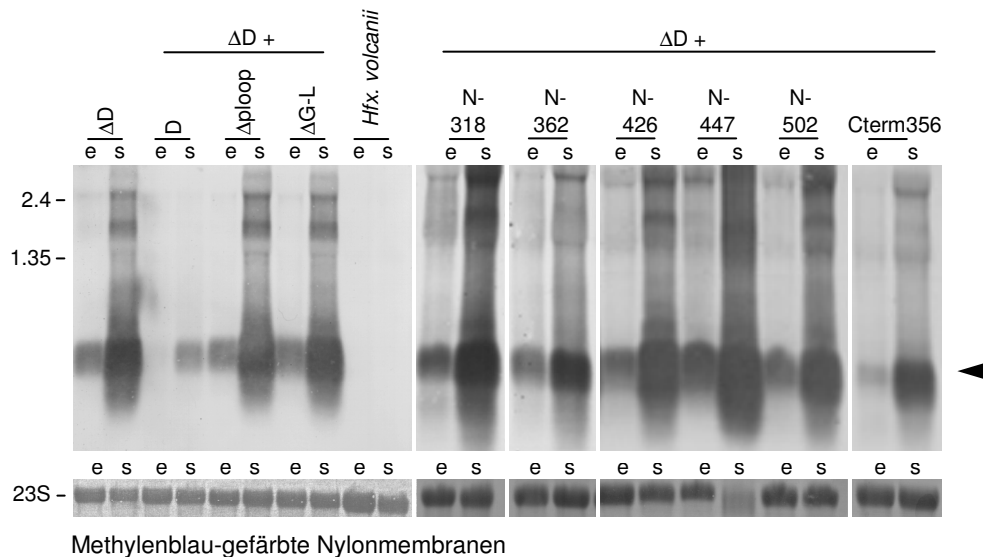


Abb. 7: Northern-Analyse zum Nachweis der mc-gvpA-mRNA in $\Delta D + D_{\text{Del}}^{\text{ex}}$ -Transformanten. Je 5 μg Gesamt-RNA isoliert aus der exponentiellen (e) und stationären Wachstumsphase (s) der *Hfx. volcanii*-Transformanten wurden über ein 1,2%iges denaturierendes Agarose-Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer mc-gvpA-spezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Die verschiedenen mcGvpD-Nterm-Deletionsvarianten sind durch die Abkürzung N- und die Anzahl ihrer Aminosäuren gekennzeichnet. Gesamt-RNA aus *Hfx. volcanii* wurde als Negativkontrolle verwendet. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran diente zur Kontrolle der Qualität und Quantität der Gesamt-RNA durch Visualisierung der 23S rRNA. Auf der linken Seite ist der RNA-Größenstandard [kb] angegeben. Der Pfeil auf der rechten Seite kennzeichnet die 300 bp große mc-gvpA-mRNA.

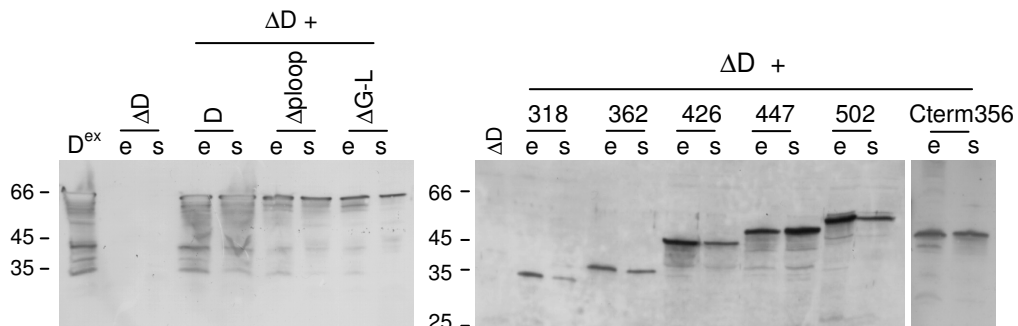


Abb. 8 Western-Analyse zum Nachweis von mcGvpD und der mcGvpD-Deletionsmutanten in $\Delta D + D_{\text{Del}}^{\text{ex}}$ -Transformanten. Je 20 μg lösliches Gesamtprotein der $\Delta D + D_{\text{Del}}^{\text{ex}}$ -*Hfx. volcanii*-Zelllysate wurden mit einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit mcGvpD-Antiserum inkubiert. Die molaren Massen [in kDa] des Protein-Größenstandards sind links angegeben.

Tabelle 4. Repressorische Funktion der mcGvpD-Deletionsmutanten.

Mutante	Repression der GV-Bildung	Repression der mc-gvpA-mRNA-Bildung
D Wildtyp	+	+
Δp -loop	-	-
ΔG -L	-	-
Nterm318	-	-
Nterm362	-	+/-
Nterm426	-	-
Nterm447	-	-
Nterm502	-	-
Cterm356	-	+/-

4.1.2 Interaktionsstudien der mcGvpD-Deletionsmutanten mit mcGvpE

Die verschiedenen mcGvpD-Deletionsmutanten wurden auch auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit mcGvpE hin getestet. Für die Interaktionsexperimente mittels Affinitätschromatographie wurde mcGvpE_{his} mit einem N-terminalen His-tag in *E. coli* M15 produziert. Die Reinigung erfolgte mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen. Zur Rückfaltung von mcGvpE_{his} wurde eine schrittweise Dialyse bis hin zu einer Kaliumchloridkonzentration von 2,5 M durchgeführt (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Hierbei wurde Kaliumchlorid verwendet, da Halobakterien bei der *salt-in*-Strategie im Inneren KCl anreichern (Dennis & Shimmin, 1997) und die meisten halobakteriellen Proteine hohe KCl-Konzentrationen benötigen, um in ihrer nativen Konformation vorzuliegen (Grant & Larsen, 1989; Kushner, 1985). Eine erfolgreiche Rückfaltung halophiler Proteine unter vergleichbaren Bedingungen konnte für das TBP-Protein von *Hbt. salinarum* (Soppa & Link, 1997) und die Glucosedehydrogenase von *Hfx. mediterranei* (Pire *et al.*, 2001) gezeigt werden. Durch Immobilisierung des rückgefalteten mcGvpE_{his}-Proteins an Ni-NTA-Agarose wurden die Affinitätschromatographiematrices hergestellt. Diese wurden mit den löslichen Proteinen der Zelllysate von *Hfx. volcanii*-Transformanten, die die entsprechenden mcGvpD-Deletionsvarianten produzierten, inkubiert. Das Vorhandensein der jeweiligen mcGvpD-Deletionsmutanten in den Zelllysaten der *Hfx. volcanii*-Transformanten wurde jeweils durch Western-Analyse mit mcGvpD-Antiserum kontrolliert (Abb. 9A-G, jeweils rechts). Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Elution des mcGvpE_{his}-Proteins mit dem eventuell gebundenen Interaktionspartner. Die letzte Waschfraktion und die Elutionsfraktionen der Interaktionsexperimente wurden dann elektrophoretisch in 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit mcGvpD-Antiserum

inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine unbeladene Ni-NTA-Matrix und als Positivkontrolle wurde eine mcGvpE_{his}-Matrix mit dem Zelllysats einer mcD^{ex}-Transformante inkubiert, die den nativen mc-gvpD-Leserahmen in pJAS35 enthielt.

Zunächst wurde die Interaktionsfähigkeit von mcGvpD-Mutanten mit mcGvpE_{his} getestet, die Veränderungen oder Deletionen im Bereich des *p-loop*-Motivs oder der basischen Region 2 aufwiesen. In beiden Fällen handelt es sich um Sequenzmotive des mcGvpD-Proteins, die eine entscheidende Rolle für die repressorische Funktion von mcGvpD auf die Gasvesikelbildung spielen. Veränderungen in diesen Bereichen des Proteins führen meist zu einer Beeinträchtigung der Funktion von mcGvpD.

Um eine eventuelle Beteiligung des *p-loop*-Motivs von mcGvpD an der Interaktion mit mcGvpE zu untersuchen, wurden die beiden Deletionsmutanten $\Delta p\text{-loop}$ und $\Delta G\text{-L}$ für Interaktionsstudien eingesetzt. Für beide mcGvpD-Mutanten konnte eine Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 9A), so dass eine Beteiligung des *p-loop*-Motivs von mcGvpD an der Interaktion mit mcGvpE ausgeschlossen werden konnte. Weiterhin untersucht wurde die mcGvpD-Mutante 3-AAA, die drei Aminosäureaustausche in der basischen Region 2 (₄₉₄RRR₄₉₆ zu ₄₉₄AAA₄₉₆) enthält und im Gegensatz zu allen anderen hier verwendeten Mutanten die Fähigkeit zur Reprimierung der Gasvesikelbildung nicht verloren hat, sondern sogar eine Art „Super-Repressor“ darstellt (Pfeifer *et al.*, 2001). Eine Interaktion der „Super-Repressor“-Mutante 3-AAA mit mcGvpE konnte gezeigt werden (Abb. 9B). Im Vergleich zum Kontrollexperiment mit dem nativen mcGvpD-Protein konnte in den Elutionsfraktionen des Interaktionsexperimentes mit 3-AAA sogar eine leicht erhöhte Proteinmenge detektiert werden (Abb. 9B).

Des weiteren wurde die Interaktionsfähigkeit der mcGvpD-Mutanten getestet, die verschieden große Deletionen der N-terminalen oder C-terminalen Domäne des Proteins aufweisen. Interaktionsexperimente mit Nterm318 zeigten, dass dieses N-terminal verkürzte mcGvpD-Protein nicht mit mcGvpE interagieren konnte (Abb. 9C). Zusammen mit der bereits untersuchten Mutante Nterm362, die ebenfalls nicht mit mcGvpE interagiert, machte dies deutlich, dass die N-terminale Domäne bis zum unkonservierten Bereich allein nicht für eine Interaktion ausreicht.

Die Deletionsmutanten Nterm426 und Nterm447 konnten dagegen mit Hilfe einer mcGvpE_{his}-Affinitätschromatographiematrix aus den Zelllysaten der entsprechenden WFD11-Transformanten isoliert werden (Abb. 9D, E), während die Mutante Nterm502 ihre Interaktionsfähigkeit mit mcGvpE verloren hatte (Abb. 9F). Da die Mutanten Nterm426 und Nterm447 mit mcGvpE interagieren und Nterm502 lediglich eine verlängerte Variante (jedoch inklusive der basischen Region 2) darstellt, könnte die Wahl des Deletionsbereiches hier zu einer ungünstigen Konformation des Proteins geführt haben, die einen Verlust der Interaktionsfähigkeit bedingte. Die Deletionsmutante Cterm356 wurde in den

Elutionsfraktionen nachgewiesen und interagiere ebenfalls mit mcGvpE_{his} (Abb. 9G). Die Ergebnisse aller Interaktionsexperimente sind in Abb. 9H zusammengefasst.

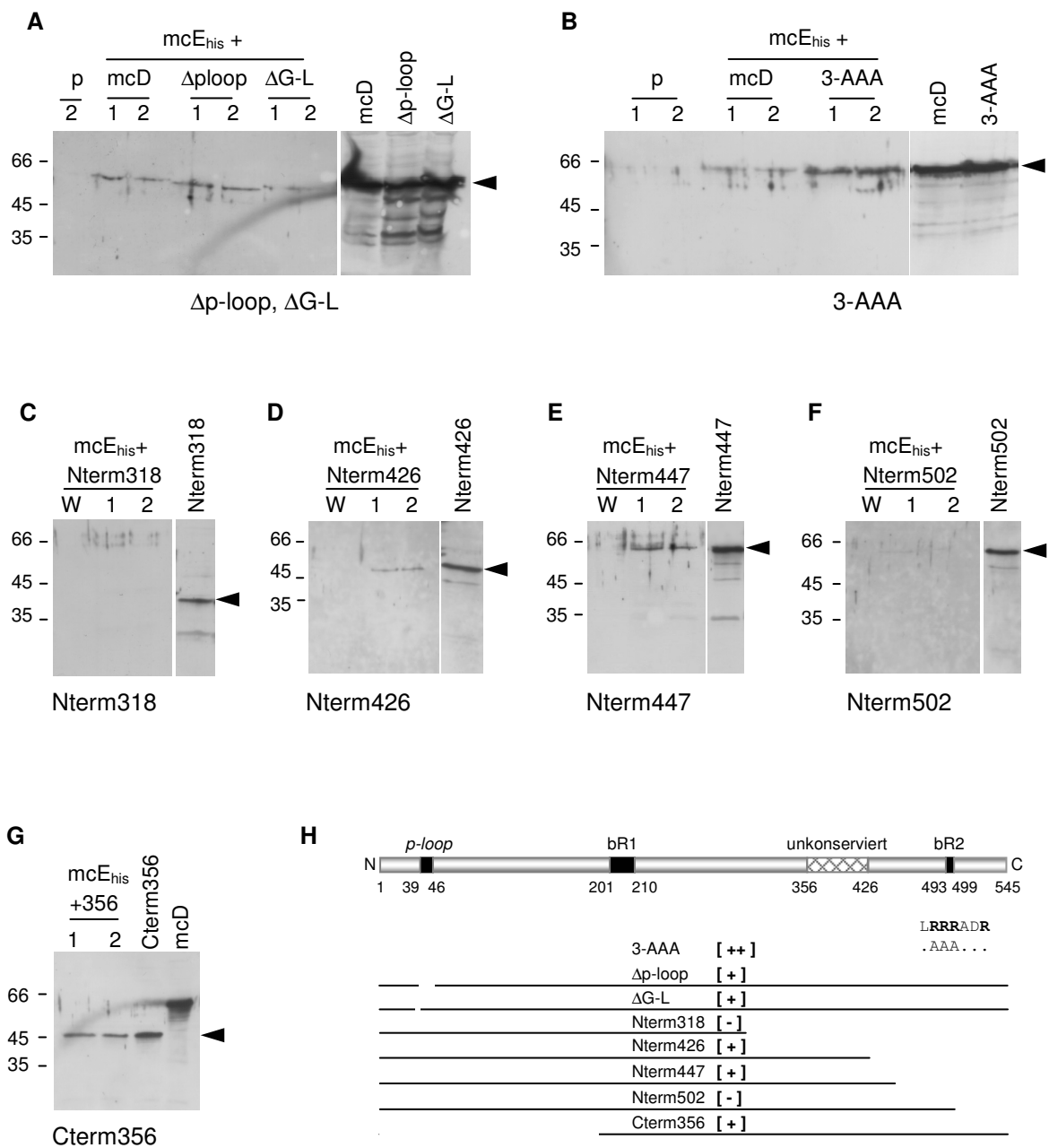


Abb. 9: Western-Analysen der Elutionsfraktionen von Affinitätschromatographien verschiedener mcGvpD-Mutanten mit mcGvpE_{his}-Matrices. In (A) und (B) sind jeweils auch die Elutionsfraktionen der Kontrollexperimente aufgetragen. Die Negativkontrolle (Inkubation eines mcGvpD-Lysates mit einer unbeladenen Ni-NTA-Matrix) ist mit p bezeichnet. Die Positivkontrolle (Interaktionsexperiment einer mcGvpE_{his}-Matrix mit nativem mcGvpD) ist mit mcD bezeichnet. Es wurden jeweils 10 µl der Elutionsfraktionen (1, 2) und 10 µl der letzten Waschfraktion verwendet. Je 10 µg (A), 20 µg (B) und 5 µg (C-F) lösliches Protein der verschiedenen Zelllysate wurden aufgetragen. Die Proben wurden nach 12%iger SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit mcGvpD-Antiserum inkubiert. Pfeile markieren die Position der jeweiligen mcGvpD-Varianten. Die molaren Massen [kDa] des Protein-Größenstandards sind jeweils links angegeben. **(H)** Zusammenfassung der Ergebnisse der Interaktionsexperimente und schematische Darstellung von mcGvpD und der verschiedenen mcGvpD-Mutanten. In eckiger Kammer neben der Mutantenbezeichnung ist jeweils ihre Fähigkeit [+] oder Unfähigkeit [-] zur Interaktion mit mcGvpE gekennzeichnet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass weder die unmittelbare N-terminale Region (fehlt in Cterm356) noch die C-terminale Region (fehlt in Nterm447) an der Interaktion mit mcGvpE beteiligt ist. Die Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, dass ein zentraler Bereich von mcGvpD in der Nähe der unkonservierten Region den GvpE-Interaktionsbereich darstellt.

4.1.3 Interaktionsstudien mit gereinigten Gvp_{his}- und *Strep*-Gvp-Proteinen

Verschiedene Gvp-Proteine konnten bisher mit Hilfe der bereits vorhandenen Plasmidkonstrukte nur als Gvp_{his}-Proteine hergestellt werden. Für Interaktionsstudien wurde der mögliche Bindungspartner in *Hfx. volcanii* ohne His-tag produziert und in einem Gesamtzelllysat für die Analysen eingesetzt. Um Interaktionsstudien mit definierten Proteinmengen durchführen und damit auch quantifizieren zu können, war es notwendig Gvp-Proteine auch in Fusion mit einem anderen tag herstellen und reinigen zu können. Die Herstellung verschiedener Gvp-Proteine als *Strep*-Gvp-Proteine erfolgte mit Hilfe des *Strep-tag*-Expressionsvektors pPR-IBA2 (IBA, Göttingen).

4.1.3.1 Klonierung verschiedener *gvp*-Gene in den *Strep-tag*-Expressionsvektor pPR-IBA2*

Für die Produktion verschiedener Gvp-Proteine als *Strep*-Gvp-Proteine wurde der Expressionsvektor pPR-IBA2 (IBA, Göttingen) verwendet. Die multiple Klonierungsregion des Expressionsvektors pPR-IBA2 wurde so modifiziert, dass bereits im pQE8 oder pBSKII(+) vorhandene *gvp*-Leserahmen mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Hind*III im Leseraster zum *Strep-tag* II inseriert werden konnten. Der so modifizierte Vektor wurde als pPR-IBA2* bezeichnet (Kapitel 3.3.8.5). Folgende Plasmidkonstrukte wurden hergestellt: mc-*gvpE*-pPR-IBA2*, mc-*gvpD*-pPR-IBA2*, mc-*gvpD*_{Mut6}-pPR-IBA2* und c-*gvpE*-pPR-IBA2* (Kapitel 3.2.6) und durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

4.1.3.2 Produktion und Reinigung von *Strep*-Gvp-Proteinen aus *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

Die bestmöglichen Produktionsbedingungen für die *Strep*-Gvp-Proteine in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS sind im Kapitel 3.3.8.5 dargestellt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Expressionsbedingungen ermittelt werden konnten, die in den meisten Fällen zu einer Proteinproduktion führten. Trotzdem konnten die erzielten Ergebnisse nicht immer

reproduziert werden und unterlagen Schwankungen. Die Ursache für diese Schwankungen konnte trotz diverser Expressionsversuche nicht geklärt werden.

Die Produktion des mcGvpE_{strep}-Proteins erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen und wurde durch IPTG induziert. Zur Reinigung des mcGvpE_{strep}-Proteins erfolgte der Zellaufschluss unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff. Das erhaltene Zelllysate wurde dann durch Dialyse in einen Hochsalzpuffer mit 2,5 M KCl überführt. Anti-chaotrope Salze der Hofmeister-Serie sind schonende Fällungsmittel, sie vergrößern hydrophobe Effekte in der Lösung und fördern somit die Proteinaggregation über hydrophobe Wechselwirkungen. Dieser Aussalz-Effekt trifft jedoch nicht für halophile Proteine zu, die eine hohe Salzkonzentration für ihre native Konformation benötigen (Grant & Larsen, 1989; Kushner, 1985). In Folge dessen war es mit Hilfe der Dialyse in 2,5 M KCl möglich, einen Teil der *E. coli*-Proteine durch Aussalzen vom mcGvpE_{strep}-Protein abzutrennen (Abb. 10A). Anschließend erfolgte die weitere Reinigung mit Hilfe einer *Strep*-Tactin-Sepharose-Säule (IBA, Göttingen). Das mcGvpE_{strep}-Protein wurde mit Hilfe eines Desthiobiotin-haltigen Puffers von der Säule eluiert und überwiegend in den Elutionsfraktionen 2 bis 4 erhalten. Die Elutionsfraktionen E2, E3 und E4 wurden vereinigt und Desthiobiotin mittels Dialyse gegen 2,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,2 entfernt. Insgesamt konnten 1,5 ml einer Proteinlösung mit 425 µg/ml mcGvpE_{strep}-Protein aus dem Zellsediment einer 50 ml Kultur erhalten werden.

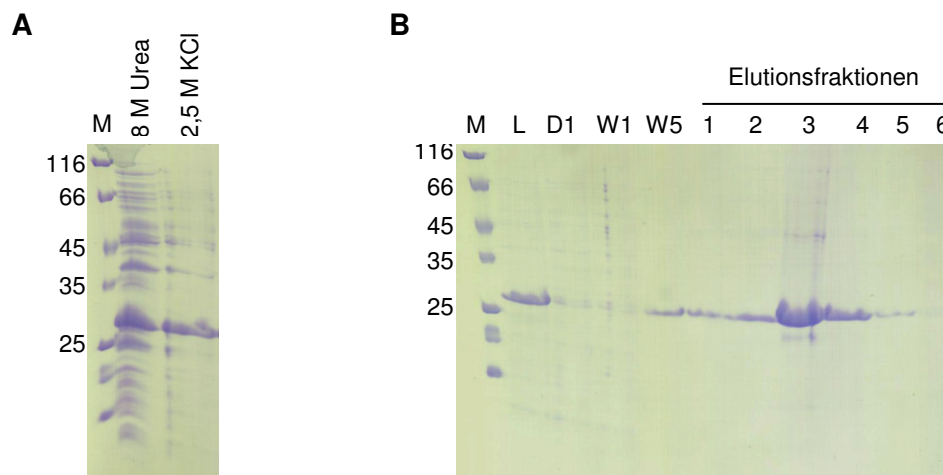


Abb. 10: Coomassie-gefärbte 12%ige SDS-Polyacrylamidgele zur Kontrolle des Reinigungserfolgs von mcGvpE_{strep} aus *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. **(A)** Aussalz-Effekt erzielt durch die Dialyse des *E. coli*-Lysates aus 8 M Harnstoff (8 M Urea) in 2,5 M KCl. Aufgetragen wurden jeweils 13 µl des Zelllysates vor und nach der Dialyse ins Hochsalz. **(B)** Fraktionen der Reinigung von mcGvpE_{strep} aus *E. coli* BL21 (DE3) pLysS über eine *Strep*-Tactin-Säule. Aufgetragen wurden je 13 µl des Lysates vor der Reinigung (L), des ersten Durchflusses (D1), der Waschfraktionen 1 (W1) und 5 (W5), sowie die Elutionsfraktionen 1-6. Die molaren Massen [kDa] des Protein-Größenstandards (M) sind links angegeben.

4.1.3.3 Interaktionsstudien mit gereinigten mcGvpD_{his}- und mcGvpE_{strep}-Proteinen

Die Affinitätschromatographie zum Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion mit zwei gereinigten und unterschiedlichen *tags* fusionierten Proteinen wurde wie in Kapitel 3.3.9.2 beschrieben durchgeführt. Für die Interaktionsstudien wurden mcGvpD_{his} in *E. coli* M15 und mcGvpE_{strep} in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS hergestellt. Beide Proteine wurden nach der Reinigung in einen Hochsalzpuffer (2,5 M KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) überführt. Zur Herstellung der Affinitätschromatographiematrix wurden 400 µg mcGvpD_{his} an 100 µl Ni-NTA-Agarose immobilisiert und anschließend mit 100 µg mcGvpE_{strep} inkubiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Elution von mcGvpD_{his} mit einem eventuell gebundenen Interaktionspartner mit Hilfe eines imidazolhaltigen Puffers. Die letzte Waschfraktion und die beiden Elutionsfraktionen wurden mit Hilfe von Western-Analysen auf die Anwesenheit von mcGvpE_{strep} hin untersucht (Abb. 11).

Für die beiden gereinigten Proteine mcGvpD_{his} und mcGvpE_{strep} konnte wie bereits erwartet eine Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 11). Als Negativkontrolle wurden 100 µg des mcGvpE_{strep}-Proteins mit einer leeren Ni-NTA Matrix inkubiert. In den Elutionsfraktionen dieser Negativkontrolle konnte kein mcGvpE_{strep} nachgewiesen werden (Abb. 11). Als weitere Kontrolle wurde auch ein Interaktionsexperiment mit einer mcGvpD_{his}-Matrix und mcGvpE_{strep} unter Zugabe von 1 mg löslichem Gesamtprotein eines *Hfx. volcanii*-Zelllysates durchgeführt. Da die bisherigen Interaktionsexperimente immer nur mit Lysaten von *Hfx. volcanii*-Transformanten oder Lysaten von *Hfx. mediterranei* erfolgten, sollte durch die Zugabe des *Hfx. volcanii*-Lysates gewährleistet werden, dass alle benötigten Faktoren für eine Interaktion der beiden Proteine zur Verfügung stehen. Ein Unterschied zwischen dem Ergebnis dieses Interaktionsexperimentes im Vergleich zu dem Experiment ohne *Hfx. volcanii*-Lysat konnte allerdings nicht festgestellt werden (Abb. 11). Das mcGvpE_{strep}-Protein wurde als eine Doppelbande mit Hilfe des mcGvpE-spezifischen Antiserums nachgewiesen, wobei es sich möglicherweise in einem Fall um eine modifizierte Form oder ein Abbauprodukt des Proteins handeln könnte.

Neben dem mcGvpE_{strep}-Protein konnte in den Elutionsfraktionen der Interaktionsexperimente auch ein Protein mit einer molaren Masse von ~7 kDa nachgewiesen werden, das möglicherweise ein Abbauprodukt des mcGvpE-Proteins darstellen könnte. Außerdem wurde ein ~20 kDa Protein durch das mcGvpE-Antiserum schwach detektiert, wobei es sich möglicherweise um die Chloramphenicoltransacetylase handelt. Dieses Protein wird in großen Mengen in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Transformanten gebildet, scheint auch in den Elutionsfraktionen des gereinigten mcGvpE_{strep}-Proteins vorhanden zu sein und wird möglicherweise durch das mcGvpE-Antiserum erkannt.

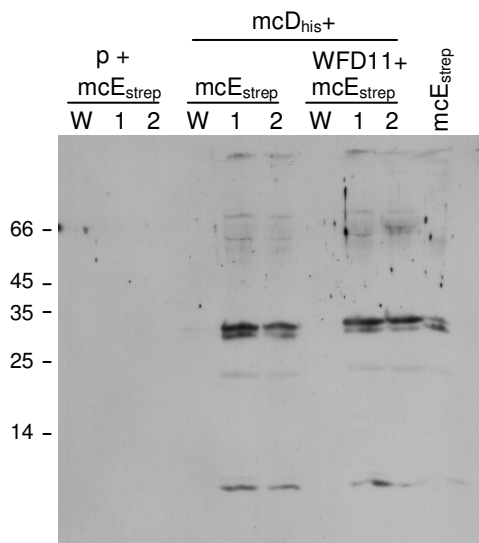


Abb. 11: Western-Analyse der Interaktions-experimente von mcGvpD_{his} mit mcGvpE_{strep}. Je 10 µl der letzten Waschfraktion (W) und der beiden Elutionsfraktionen (1, 2) sowie 0,1 µg des mcGvpE_{strep}-Proteins (mcGvpE_{strep}) wurden mit Hilfe eines 12%igen SDS-Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit mcGvpE-spezifischem Antiserum inkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine leere Ni-NTA-Matrix mit mcGvpE_{strep} inkubiert (p). Bei einem Interaktionsexperiment wurde zusätzlich 1 mg lösliches Gesamtprotein aus *Hfx. volcanii* hinzugefügt (WFD11).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Interaktion von mcGvpD_{his} und mcGvpE_{strep} auch gezeigt werden kann, wenn beide Proteine in *E. coli* produziert werden und in gereinigter Form vorliegen. Weitere Faktoren, die in Lysaten von *Hfx. volcanii* vorhanden sind, scheinen für die Interaktion nicht benötigt zu werden.

Eine nähere Untersuchung der Interaktion von mcGvpD_{his} und mcGvpE_{strep} unter Verwendung eines IAsys Resonant Mirror Biosensors scheiterte, da die hohen Salzkonzentrationen in den verwendeten Puffern die Messwerte stark beeinflussten.

4.2 *In vivo*-Studien zur Untersuchung der mcGvpD-induzierten Reduktion der GvpE-Proteinmenge

Die gleichzeitige Anwesenheit von mcGvpD und mcGvpE in einer *Hfx. volcanii*-Transformante führt zu einer deutlich reduzierten mcGvpE-Menge in den Zellen (Zimmermann & Pfeifer, 2003). *Hfx. volcanii*-Transformanten, die den mc-gvpE-Leserahmen unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors in pJAS35 (E^{ex}) tragen, enthalten große Mengen des mcGvpE-Proteins, wohingegen in Transformanten, die die mc-gvpDE-Leserahmen in pJAS35 (DE^{ex}) enthalten, kein mcGvpE-Protein nachgewiesen werden kann. ΔDE^{ex}-Transformanten mit einer 918 bp Deletion im mc-gvpD-Leserahmen enthalten dagegen wieder große Mengen von mcGvpE (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, dass die Gegenwart von mcGvpD zu einer Reduktion der mcGvpE-Menge führt. Weiterhin konnte in DE^{ex}-Transformanten auch kein 61 kDa mcGvpD-Protein, sondern lediglich ein Degradationsprodukt nachgewiesen werden (Zimmermann & Pfeifer, 2003).

Um diesen Effekt näher zu charakterisieren, sollte der Einfluss verschiedener mcGvpD-Mutanten auf die mcGvpE-Proteinmenge analysiert werden. Die hier untersuchten mcGvpD-Mutanten sind in Abb. 12 nochmals zusammengefasst. Es wurden sowohl mcGvpD-Substitutionsmutanten (Pfeifer *et al.*, 2001) als auch Deletionsmutanten (Scheuch, 2003 und diese Arbeit) für die *in vivo*-Analysen eingesetzt. Mit Ausnahme von Nterm318, Nterm362 und Nterm502 konnte bereits für alle hier verwendeten mcGvpD-Mutanten eine Interaktion mit mcGvpE nachgewiesen werden (Scheuch, 2003 und diese Arbeit). In Bezug auf die Reprimierung der Gasvesikelbildung in $\Delta D + D_{Mut}^{ex}$ -Transformanten konnte gezeigt werden, dass alle mcGvpD-Mutanten außer dem „Super-Repressor“ 3-AAA, keine Repression der Gasvesikelbildung mehr erzeugen können und funktionell defekt sind (Pfeifer *et al.*, 2001 und diese Arbeit). Die repressorische Funktion der beiden Mutanten Nterm362 und Cterm356 ist zwar reduziert, scheint allerdings nicht vollkommen aufgehoben zu sein. Die repressorische Funktion der verschiedenen mcGvpD-Mutanten und ihre Fähigkeit mit mcGvpE zu interagieren ist in Abb. 12 dargestellt.

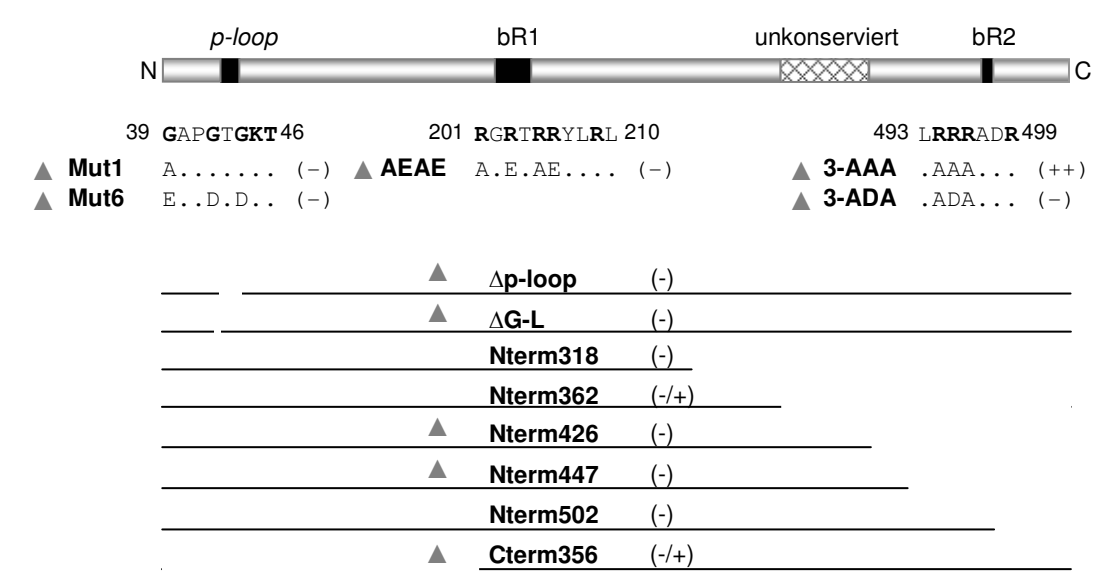


Abb. 12: Schematische Darstellung des mcGvpD-Proteins und verschiedener mcGvpD-Mutanten. Das *p-loop*-Motiv und die basischen Regionen bR1 und bR2 sind hervorgehoben. Veränderungen der Substitutionsmutanten (Pfeifer *et al.*, 2001) sind darunter mit der Angabe ihrer Position in mcGvpD dargestellt. Ihre Fähigkeit (++) oder Unfähigkeit (-) zur Reprimierung der Gasvesikelbildung in $\Delta D + D_{Mut}^{ex}$ -Transformanten ist angegeben. Die Linien stellen die verschiedenen mcGvpD-Deletionsmutanten schematisch dar. Die Interaktionsfähigkeit der mcGvpD-Mutanten mit mcGvpE ist durch das Symbol ▲ gekennzeichnet.

Zur Vereinfachung der Durchführung dieser *in vivo*-Analysen war es experimentell vorteilhaft, die nachfolgenden Untersuchungen in *Hfx. volcanii*-Transformanten durchzuführen, die den *gvpE*-Leserahmen und den mc-*gvpD*_{Mut}-Leserahmen auf unterschiedlichen Plasmidvektoren

tragen. Dies würde es ermöglichen, viele der bereits vorhandenen Plasmidkonstrukte für die Analysen zu verwenden.

Deshalb musste zunächst kontrolliert werden, ob der reduzierende Effekt von mcGvpD auf die GvpE-Menge auch beobachtet werden kann, wenn beide Gene von zwei verschiedenen Plasmiden aus exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurde der halobakterielle Vektor pWL102 (Lam & Doolittle, 1989) mit dem *fdx*-Promotor versehen, um neben dem pJAS35-Vektor (Pfeifer *et al.*, 1994; M. Mevarech, nicht publiziert) einen zweiten Expressionsvektor zur Verfügung zu haben. Die Verwendung des gleichen Promotors (*fdx*-Promotor) sowie die ähnliche Kopienzahl der beiden Plasmidvektoren in der Zelle sollten zu ähnlich großen Proteinmengen führen. Analog den beschriebenen D^{ex} -, D_{Mut}^{ex} -, DE^{ex} - und ΔDE^{ex} -pJAS35-Konstrukten fehlt auch den pWL_{fdx}-Konstrukten der für die 82 nt große Leitregion der mc-*gvpD*-mRNA kodierende Bereich.

4.2.1 Herstellung des Expressionsvektors pWL_{fdx} durch Inserierung des *fdx*-Promotors in pWL102

Zur Amplifikation des *fdx*-Promotors wurde das p-*gvpA*/ΔL-pJAS35-Plasmidkonstrukt (Sartorius-Neef, 2000) als Matrize und die beiden Oligonukleotide fdxProm-BspHI und M13 Universal* verwendet. Das 469 bp PCR-Produkt wurde mit Hilfe der künstlich eingeführten *Bsp*HI- und *Acc*65I-Schnittstellen in pWL102 inseriert. Der halobakterielle *shuttle*-Vektor wurde dazu mit *Nco*I und *Acc*65I hydrolytisch gespalten und mit dem 408 bp *Bsp*HI-*Acc*65I-*P_{fdx}-gvpA*-Fragment ligiert, da *Bsp*HI und *Nco*I gleiche überhängende Enden erzeugen. Die Ligation der beiden kompatiblen *Bsp*HI/*Nco*I-Enden führt zur Zerstörung der im pWL102 enthaltenen *Nco*I-Schnittstelle. Gleichzeitig wird durch das inserierte Promotorfragment eine neue *Nco*I-Schnittstelle zur Verfügung gestellt.

Der so hergestellte Expressionsvektor pWL_{fdx} ist ein Derivat des halobakteriellen *shuttle*-Vektors pWL102 (Lam & Doolittle, 1989), der den *P_{fdx}*-Promotor als 78 bp *Bsp*HI-*Nco*I-Fragment (= 73 bp *P_{fdx}*-Promotorsequenz mit dem ATG Startcodon und den ersten drei Nukleotiden des *fdx*-Leserahmens sowie 5 Nukleotiden der *Bsp*HI-Schnittstelle) und ein *Nco*I-*Acc*65I-Fragment (bestehend aus dem 230 bp p-*gvpA*-Leserahmen, 46 bp der p-vac Region stromabwärts des Stopcodons von *gvpA* und 54 bp von pBluescript II SK(+)) enthält (Abb. 13). Leserahmen zur Expression können als *Nco*I-*Acc*65I-Fragmente inseriert werden, nachdem das 330 bp p-*gvpA*-pBISK(+)-Fragment entfernt wurde (Abb. 13). Die Expression der Leserahmen ausgehend vom *P_{fdx}*-Promotor führt zu Proteinen, die N-terminal zwei zusätzliche Aminosäuren (Methionin und Prolin) enthalten, analog den Proteinen, die ausgehend vom *P_{fdx}*-Promotor im Expressionsvektor pJAS35 produziert werden.

Die Plasmidkonstrukte $mcD_{pWL-fdx}$, $D_{3-AAA-pWL}$, $D_{Mut6-pWL}$ und $cE_{pWL-fdx}$ wurden durch Verwendung der entsprechenden pJAS35-Plasmidkonstrukte als DNA-Matrize hergestellt. Die durch hydrolytische Spaltung der pJAS35-Konstrukte erhaltenen *NcoI*-*Acc65I*-Fragmente wurden in den ebenso behandelten pWL_{fdx} -Vektor inseriert.

Um die Richtigkeit der hergestellten pWL_{fdx} -Konstrukte zu überprüfen, wurde ein 5'-fluoreszenzmarkiertes (IRD800) Oligonukleotid verwendet, das im pHV2-Teil des Vektors 199 bp vor der Insertionsstelle des *fdx*-Promotors bindet. Die Bindestelle des $pWL(NcoI)$ -Sequenzprimers im pWL_{fdx} -Vektor ist in Abb. 13 dargestellt.

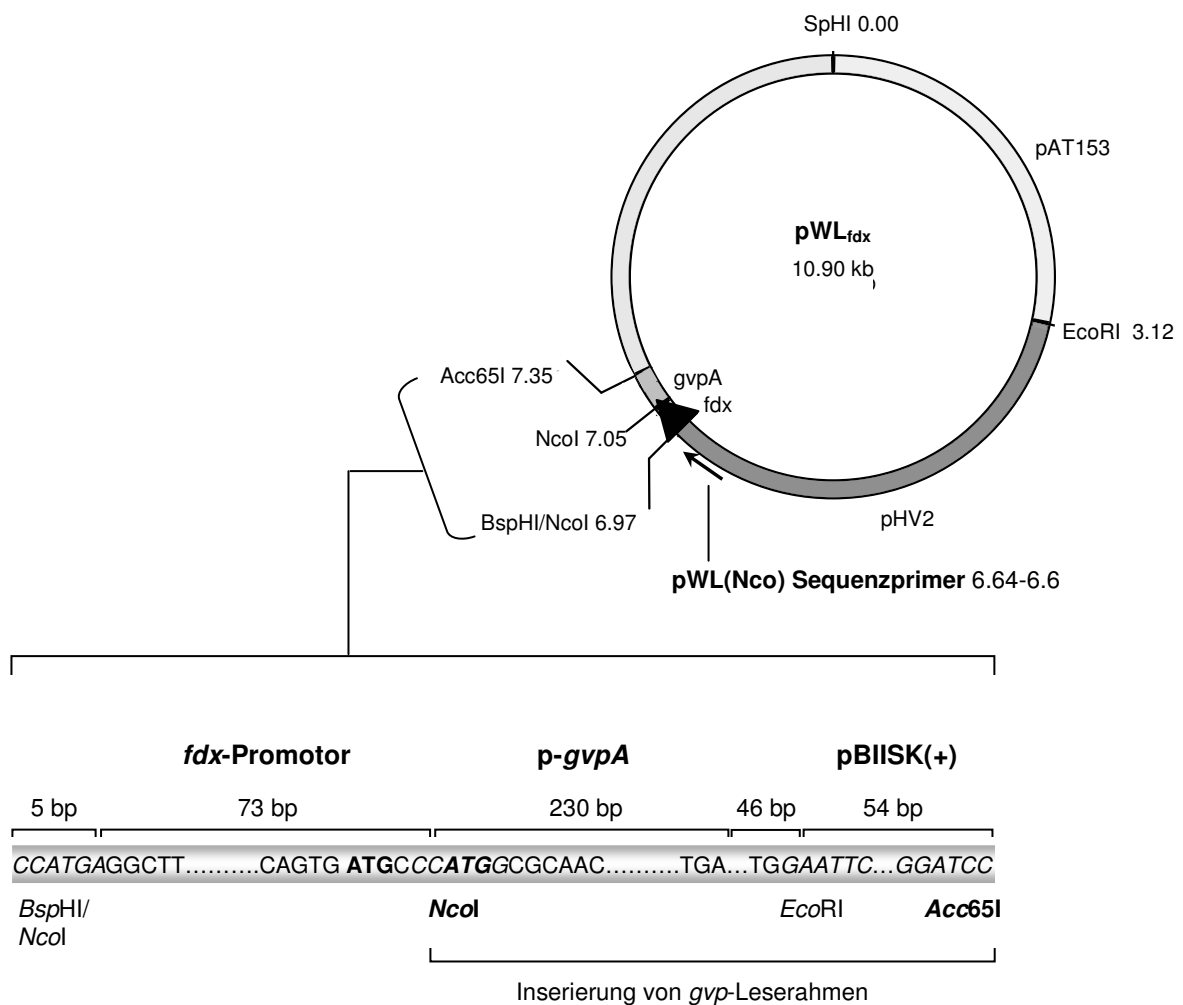


Abb. 13: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pWL_{fdx} . Das inserierte *BspHI*-*Acc65I*-*fdx*-Promotor-*gvpA*-Fragment ist im unteren Teil der Abbildung detailliert abgebildet. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind kursiv dargestellt. Das Startcodon des *fdx*-Gens sowie das Startcodon des *gvp*-Leserahmens sind fett hinterlegt. Punkte dienen als Platzhalter für nicht dargestellte Sequenzbereiche. Die *BspHI/NcoI*-Hybridschnittstelle wird nicht mehr von den entsprechenden Restriktionsendonukleasen erkannt. Leserahmen können als *NcoI*-*Acc65I*-Fragmente inseriert werden.

4.2.2 Untersuchung der GvpE- und mcGvpD-Proteinmengen in $E^{ex}+mcD_{Mut}^{ex}$ -*Hfx. volcanii*-Transformanten

In einer ersten Testreihe wurden *Hfx. volcanii*-Doppeltransformanten hergestellt, um zu untersuchen, ob der Effekt der Reduktion der GvpE-Menge auch vorliegt, wenn die *gvpE*- und *gvpD*-Leserahmen von zwei verschiedenen Plasmiden aus exprimiert werden. Um das mcGvpE-Protein in den Transformanten zu produzieren, wurde das mcE^{ex} -Konstrukt verwendet, das den mc-*gvpE*-Leserahmen in pJAS35 enthält. Zur Produktion des nativen mcGvpD-Proteins oder der mcGvpD-Mutanten wurde das $mcD_{pWL-fdx}$ -Konstrukt verwendet. Die entsprechenden *Hfx. volcanii*-Transformanten wurden durch Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide und Southern-Analyse überprüft sowie die Richtigkeit bestätigt. Die Anwesenheit des mcGvpD-Proteins in $mcD_{pWL-fdx}$ (= mcD), $mcD_{pWL-fdx}+pJAS35$ (= mcD+pJAS) und $mcD_{pWL-fdx}+mcE^{ex}$ (= mcD+ mcE^{ex})-Transformanten wurde anschließend mittels Western-Analyse untersucht (Abb. 14A). In allen Transformanten konnte das 61 kDa mcGvpD-Protein sowohl in der exponentiellen als auch der stationären Wachstumsphase in ähnlichen Mengen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den früheren Untersuchungen mit DE^{ex} -Transformanten, in denen kein 61 kDa mcGvpD-Protein, sondern lediglich ein Degradationsprodukt nachweisbar war (Zimmermann & Pfeifer, 2003). Die $mcD_{pWL-fdx}+pJAS35$ -Transformanten dienten als Kontrolle zu $mcD_{pWL-fdx}$ -Transformanten, um auszuschließen, dass die Anwesenheit eines zweiten Vektors allein zu einer Reduktion der Proteinmenge führt. In weiteren Western-Analysen wurde die mcGvpE-Proteinmenge zum einen in $mcD_{pWL-fdx}+mcE^{ex}$ -Transformanten und zum anderen als Kontrolle in mcE^{ex} -Einzeltransformanten und $mcE^{ex}+pWL_{fdx}$ -Doppeltransformanten untersucht. In den mcE^{ex} - und $mcE^{ex}+pWL_{fdx}$ -Transformanten konnten große Mengen des mcGvpE-Proteins sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase nachgewiesen werden, wohingegen die mcGvpE-Menge in $mcD_{pWL-fdx}+mcE^{ex}$ -Transformanten stark reduziert war (Abb. 14B). Dieses Ergebnis bestätigte die Beobachtung der DE^{ex} -Transformanten (Zimmermann & Pfeifer, 2003) und machte deutlich, dass dieser Effekt auch beobachtet wird, wenn beide Proteine von zwei verschiedenen Vektoren aus produziert werden. Infolgedessen war es möglich, die diversen mcGvpD-Mutanten in der entsprechenden Versuchsanordnung auf ihre Reduktionsfähigkeit der GvpE-Menge hin zu testen.

Zunächst wurde der Einfluss der mcGvpD-„Super-Repressor“-Mutante 3-AAA (Substitutionen in bR2) und der mcGvpD-Mutante Mut6 (Substitutionen im *p-loop*-Motiv) auf die mcGvpE-Menge *in vivo* analysiert. Die Untersuchungen wurden analog zu den Testreihen mit dem mcGvpD-Wildtyp-Protein durchgeführt. Zur Produktion des mcGvpE-Proteins wurde das mcE^{ex} -Plasmidkonstrukt verwendet und die beiden mcGvpD-Mutanten 3-AAA und Mut6

wurden ausgehend vom pWL_{fdx^-} -Vektor produziert. In $mcE^{ex}+D_{3-AAA-pWL}$ -Transformanten konnte nahezu kein mcGvpE-Protein mehr detektiert werden (Abb. 14B), was andeutete, dass die gleichzeitige Anwesenheit des „Super-Repressors“ mcGvpD_{3-AAA} in der Zelle eine starke Reduktion der mcGvpE-Menge bewirkte. Für des mcGvpD_{Mut6}-Protein konnte nur eine leichte Reduktion der mcGvpE-Menge beobachtet werden, was entweder auf die geringere Menge von mcGvp_{Mut6} (Abb. 14A) zurückzuführen sein könnte oder auf einen Defekt in der mcGvpD_{Mut6}-Aktivität. Unter Berücksichtigung von später erzielten Ergebnissen mit der $\Delta p-loop$ -Deletionsmutante (Abb. 15C), die keinerlei Reduktion der GvpE-Menge hervorrufen konnte, lässt sich allerdings sagen, dass ein funktionelles $p-loop$ -Motiv benötigt wird, um die GvpE-Menge in $E^{ex}+D^{ex}$ -Transformanten reduzieren zu können. Deshalb ist der hier beobachtete Effekt nicht auf die geringere mcGvpD_{Mut6}-Menge, sondern auf die Mutation im $p-loop$ -Motiv zurückzuführen, welche die reduzierende Wirkung des mcGvpD_{Mut6}-Proteins beeinflusst.

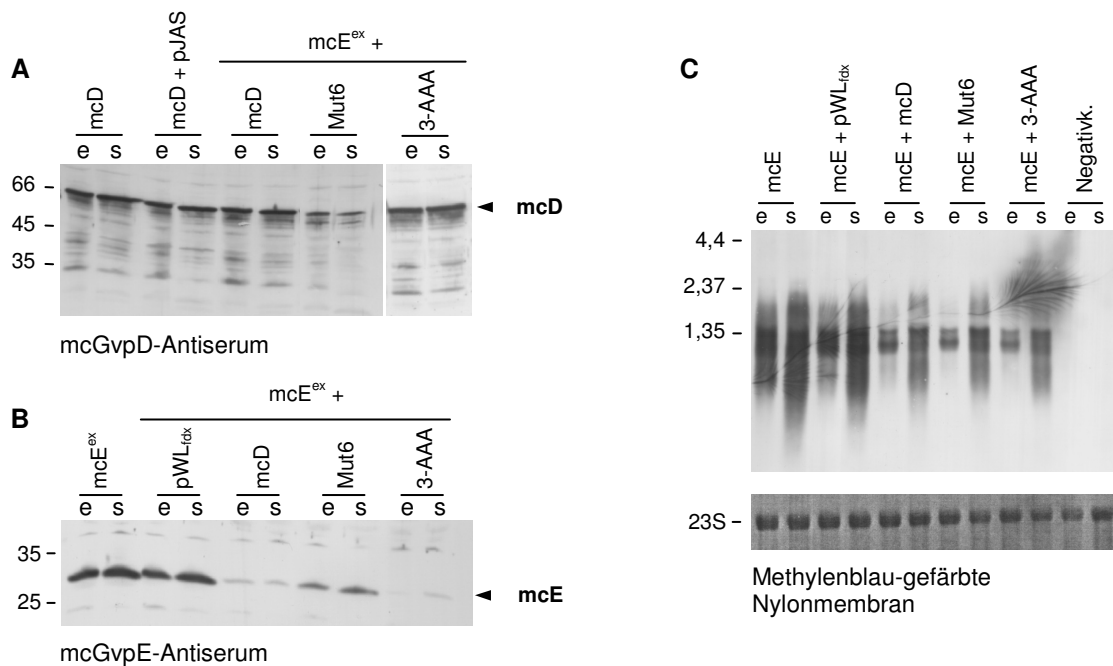


Abb. 14: (A, B) Western-Analysen zum Nachweis von mcGvpD und mcGvpE in $mcE^{ex}+mcD_{Mut-pWL}$ - (oder $mcD_{pWL-fdx^-}$) Transformanten. Je 10 μ g der löslichen Proteine der Zelllysate von *Hfx. volcanii*-Transformanten aus der exponentiellen (e) oder stationären Wachstumsphase (s) wurden mit 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit mcGvpD- (A) oder mcGvpE-spezifischem (B) Antiserum inkubiert. Die molaren Massen [kDa] des Protein-Größenstandards sind links angegeben. (C) Northern-Analyse zum Nachweis der *mc-gvpE*-Transkripte in $mcE^{ex}+mcD_{Mut-pWL}$ -Transformanten. Je 5 μ g Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch mit einem 1,2%igen Agarose-Formaldehydgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer strangspezifischen *mc-gvpE*-RNA-Sonde hybridisiert. Als Negativ-Kontrolle (Negativk.) diente Gesamt-RNA aus einer mcD^{ex} -Transformante. Die Methyleneblau-gefärbte Nylonmembran zur Kontrolle der Qualität und Quantität der Gesamt-RNA (hier: Visualisierung der 23S rRNA) ist darunter gezeigt. Der RNA-Größenstandard [kb] ist links angegeben.

Um sicherzustellen, dass der reduzierende Effekt in den Transformanten auf der Proteinebene und nicht auf der Transkriptionsebene stattfand, wurde eine Northern-Analyse

mit einer *mc-gvpE*-RNA-Sonde durchgeführt, um die Transkriptmengen zu bestimmen (Abb. 14C). In den mcE^{ex} - und $mcE^{ex}+pWL_{fdx}$ -Transformanten konnten ähnliche Transkriptmengen nachgewiesen werden, mit jeweils größeren Mengen in der stationären Wachstumsphase. In den $mcE^{ex}+mcD_{pWL-fdx}$, $mcE^{ex}+D_{Mut6-pWL}$ und $mcE^{ex}+D_{3-AAA-pWL}$ -Transformanten wurden leicht reduzierte, jedoch vergleichbare *mc-gvpE*-Transkriptmengen nachgewiesen (Abb. 14C). Da im Expressionsvektor pJAS35 kein Transkriptionsterminationssignal vorhanden ist, wurden in der Northern-Analyse auch Transkripte detektiert, die länger als das 600 bp *mc-gvpE*-Transkript sind. Die Spezifität der *mc-gvpE* RNA-Sonde wurde mit Hilfe einer Negativkontrolle bestätigt, hierfür wurde Gesamt-RNA aus einer mcD^{ex} -Transformante verwendet.

Da die in den $mcE^{ex}+mcD_{pWL-fdx}$, $mcE^{ex}+D_{Mut6-pWL}$ und $mcE^{ex}+D_{3-AAA-pWL}$ -Transformanten nachweisbaren Proteinmengen sehr unterschiedlich, die *mc-gvpE* Transkriptmengen jedoch gleich sind, zeigen diese Ergebnisse, dass der reduzierende Effekt von mcGvpD auf mcGvpE nicht auf der Transkriptionsebene stattfindet. Die mcGvpD-vermittelte Reduktion der mcGvpE-Menge findet vielmehr auf der Proteinebene statt, könnte jedoch auch durch eine Beeinflussung der Translationseffizienz hervorgerufen werden.

Die Untersuchung aller weiteren mcGvpD-Mutanten fand in Transformanten statt, die den *c-gvpE*-Leserahmen (aus der *c-vac*-Region von *Hbt. salinarum*) in pWL_{fdx} und die jeweiligen *mc-gvpD*_{Mut}-Leserahmen in pJAS35 enthielten. Diese Versuchsanordnung wurde gewählt, da die meisten *mc-gvpD*_{Mut}-Leserahmen in pJAS35 inseriert vorlagen. Aus früheren Interaktionsexperimenten mit cGvpE und mcGvpD war bekannt, dass auch eine Interaktion der beiden regulatorischen Proteine verschiedener *vac*-Regionen möglich ist (Scheuch, 2003). Somit sollte der reduzierende Effekt auf die cGvpE-Menge in der Gegenwart von mcGvpD in $cE_{pWL-fdx}+mcD^{ex}$ -Transformanten auch beobachtet werden können. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden zunächst $cE_{pWL-fdx}+pJAS35$ -Transformanten im Vergleich zu $cE_{pWL-fdx}+mcD^{ex}$ -Transformanten untersucht. Die Anwesenheit des pJAS35-Vektors allein führte zu keiner Reduktion der cGvpE-Menge (Abb. 15C), wohingegen bei gleichzeitiger Anwesenheit des mcGvpD-Proteins in den $cE_{pWL-fdx}+mcD^{ex}$ -Transformanten die cGvpE-Menge stark reduziert war (Abb. 15C). Folglich konnte der reduzierende Effekt von mcGvpD auch in dieser heterologen Konstellation mit cGvpE beobachtet werden, und der Effekt aller weiteren mcGvpD-Mutanten in dieser Versuchsanordnung getestet werden. Alle Transformanten, die zusätzlich zu $cE_{pWL-fdx}$ die verschiedenen mutierten oder deletierten *mc-gvpD*-Leserahmen in pJAS35 enthielten, produzierten die jeweilige mcGvpD-Mutante in ausreichender Menge (Abb. 15A, B). Außer für das native mcGvpD-Protein konnte für keine der hier untersuchten mcGvpD-Mutanten ein reduzierender Effekt auf die cGvpE-Proteinmenge nachgewiesen werden (Abb. 15C, D).

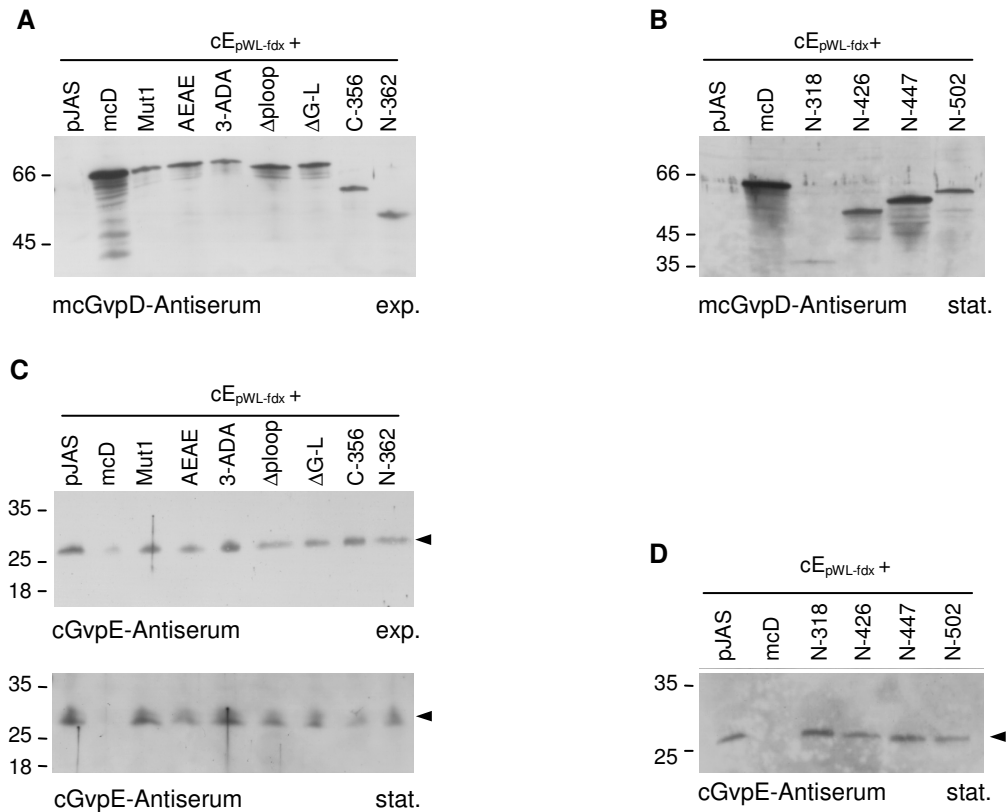


Abb. 15: Western-Analysen zum Nachweis von cGvpE und mcGvpD/mcGvpD_{Mut} in den cE_{pWL-fdx+} mcD_{Mut}^{ex} (oder mcD^{ex})-Transformanten. Je 10 µg (**A, C**) oder 20 µg (**B, D**) der löslichen Proteine der Zelllysate von *Hfx. volcanii*-Transformanten aus der exponentiellen (**A, C oben**) oder stationären Wachstumsphase (**B, C unten, D**) wurden mit 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit mcGvpD-spezifischem (**A, B**) oder cGvpE-spezifischem (**C, D**) Antiserum inkubiert. Pfeile markieren das detektierte cGvpE-Protein. Die molaren Massen [kDa] des Protein-Größenstandards sind links angegeben.

Durch Northern-Analysen konnten in den verschiedenen Transformanten vergleichbare c-*gvpE*-Transkriptmengen nachgewiesen werden (Abb. 16A, B), was erneut zeigte, dass der reduzierende Effekt von mcGvpD auf der Proteinebene stattfinden muss.

Die durch *in vivo*-Analysen erhaltenen Ergebnisse machen deutlich, dass sowohl ein funktionales *p-loop*-Motiv als auch eine intakte basische Region 1 für die reduzierende Eigenschaft von mcGvpD auf GvpE benötigt werden. Im Gegensatz dazu wurden für die mcGvpD-Mutanten mit Veränderungen in der basischen Region 2 unterschiedliche Ergebnisse erhalten. So führte der Super-Repressor 3-AAA zu einer starken Reduktion der GvpE-Proteinmenge in den Transformanten, wohingegen die mcGvpD-Mutante 3-ADA keinen Effekt auf die GvpE-Menge hatte. Die beiden mcGvpD-Mutanten unterscheiden sich nur in einer einzigen Aminosäure an Position 495. Bei der Mutante 3-ADA wurde das ursprünglich an dieser Position enthaltene Arginin gegen ein Aspartat und bei der Mutante 3-AAA gegen ein Alanin ausgetauscht. Somit zerstört eine negativ geladene Aminosäure an dieser Position die Fähigkeit von mcGvpD, eine Reduktion der GvpE-Proteinmenge zu induzieren.

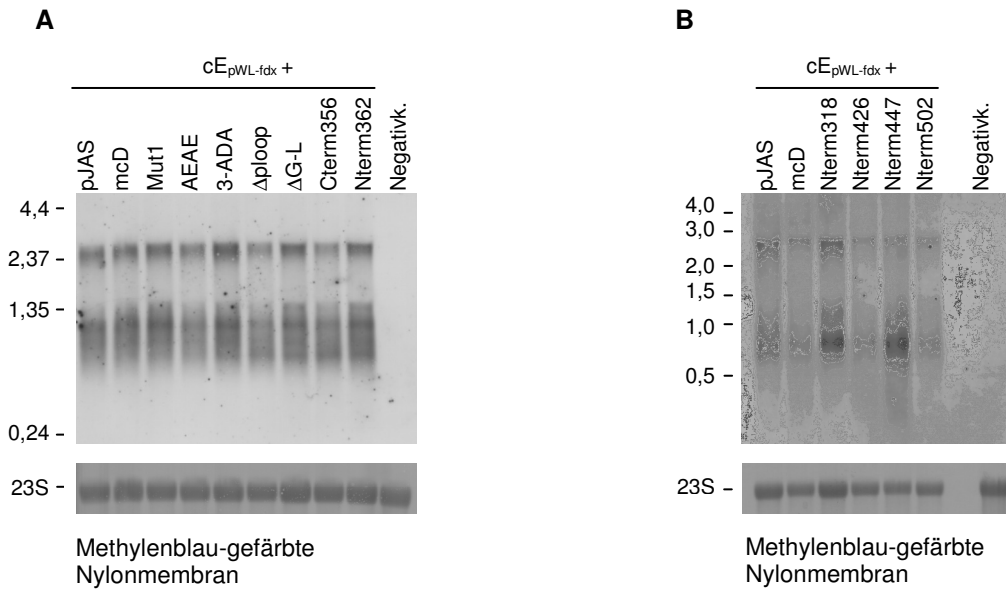


Abb. 16: (A, B) Northern-Analysen zum Nachweis der *c-gvpE*-Transkripte in cE_{pWL-fdx}+mcD_{Mut}^{ex}-Transformanten. Je 5 µg Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch über ein denaturierendes 1,2%iges Agarose-Formaldehydgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer *c-gvpE*-DNA-Sonde hybridisiert. Als Negativ-Kontrolle (Negativk.) wurde Gesamt-RNA aus einer mcD^{ex}+pJAS-Transformante verwendet. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran zur Kontrolle der Qualität und Quantität der Gesamt-RNA (hier: Visualisierung der 23S rRNA) ist darunter gezeigt. Der RNA-Größenstandard [kb] ist links angegeben.

Die Ergebnisse der *in vivo*-Analysen sind in Tabelle 5 mit Angabe der repressorischen Funktion und der GvpE-Interaktionsfähigkeit der mcGvpD-Mutanten zusammengefasst.

Tabelle 5. Eigenschaften der mcGvpD/mcGvpD_{Mut}-Proteine.

Mutante	Repression der GV-Bildung	Interaktion mit mcGvpE	Gegenwart von GvpE in D _{Mut} ^{ex} +E ^{ex} Transformanten
D Wildtyp	+	+	-
Mut1	-	+	+
Mut6	-	+	+
AEAE	-	+	+
3-ADA	-	+	+
3-AAA	++	++	-
Δp-loop	-	+	+
ΔG-L	-	+	+
Nterm318	-	-	+
Nterm362	(-/ +)	-	+
Nterm426	-	+	+
Nterm447	-	+	+
Nterm502	-	-	+
Cterm356	(-/ +)	+	+

4.2.3 Indirekte quantitative Analyse der mcGvpD-induzierten Reduktion der mcGvpE-Proteinmenge durch Ermittlung der P_{mcA} -Promotoraktivität

Um den reduzierenden Effekt von mcGvpD auf die mcGvpE-Proteinmenge in einer quantitativeren Art untersuchen zu können, wurde das *bgaH*-Reporter-gen-System verwendet. Das *bgaH*-Reporter-gen stammt aus *Hfx. lucentense* und kodiert für ein Enzym mit einer β -Galaktosidaseaktivität (Holmes, *et al.*, 1997; Holmes & Dyll-Smith, 2000). Das *bgaH*-Gen wurde bereits eingesetzt, um Promotorstudien in *Hbt. salinarum* (Patenge *et al.*, 2000) und *Hfx. volcanii*-Transformanten durchzuführen (Gregor & Pfeifer, 2001; Gregor & Pfeifer, 2005). Der Einfluss von mcGvpD und verschiedener mcGvpD-Mutanten auf die mcGvpE-Menge sollte durch Bestimmung der mcGvpE-vermittelten Aktivierung des P_{mcA} -Promotors bestimmt werden. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass bei den geringen mcGvpE-Mengen, die unter der P_{mcD} -Kontrolle produziert werden, ein linearer Zusammenhang zwischen der mcGvpE-Menge und der P_{mcA} -Aktivität besteht. Die Transkription ausgehend vom P_{mcA} -Promotor wird durch das mcGvpE-Protein aktiviert (Röder & Pfeifer, 1996; Gregor & Pfeifer, 2001). Reporter-genanalysen zur Regulation der P_{mcA} -Aktivität machten deutlich, dass die Anwesenheit von mcGvpD zu einer negativen Beeinflussung der mcGvpE-aktivierten P_{mcA} -Aktivität führt, die durch eine Deletion im mc-*gvpD*-Leserahmen wieder aufgehoben werden kann (Zimmermann & Pfeifer, 2003).

Für die Analysen wurde das mcA-*bgaH*- Δ DEF-Plasmidkonstrukt (Zimmermann, 2003) verwendet, das das *bgaH*-Reporter-gen unter der Kontrolle des P_{mcA} -Promotors und die mc-*gvp* Δ DEF-Gene (mit einer 918 bp Deletion in mc-*gvpD*) unter der Kontrolle des P_{mcD} -Promotors enthält. Das für die Reporter-genanalysen verwendete mcA-*bgaH*- Δ DEF-Plasmidkonstrukt beinhaltet neben dem mc-*gvpD* Leserahmen mit einer 918 bp Deletion und dem mc-*gvpE*-Leserahmen noch den mc-*gvpF*-Leserahmen. Die Anwesenheit des mc-*gvpF*-Gens kann hier allerdings vernachlässigt werden, da die Expression unter der nativen P_{mcD} -Kontrolle nur zu geringen mcGvpF-Mengen führt, die während der stationären Wachstumsphase nicht mehr nachweisbar sind und die P_{mcA} -Promotoraktivität nicht beeinflussen (Zimmermann, 2003). Die untersuchten *Hfx. volcanii*-Transformanten enthielten zusätzlich zum mcA-*bgaH*- Δ DEF-Konstrukt ein pJAS35-Plasmidkonstrukt, das den mc-*gvpD*- oder mc-*gvpD*_{Mut}-Leserahmen unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors trägt. Der Einfluss eines konstitutiv gebildeten mcGvpD- oder mcGvpD_{Mut}-Proteins auf die mcGvpE-Proteinmenge sollte sich somit in der durch den P_{mcA} -Promotor vermittelten BgaH-Aktivität widerspiegeln. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass das mcGvpD-Protein keine direkte Wirkung auf die P_{mcA} -Aktivität besitzt, wenn es unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors produziert wird (Zimmermann, 2003) und somit hier die indirekte Wirkung durch den Einfluss auf mcGvpE beobachtet wird.

Die verschiedenen *Hfx. volcanii*-Transformanten (Tabelle 6) wurden als Flüssigkulturen in 3 M Vollmedium angezogen und das Vorhandensein der gewünschten Plasmidkonstrukte durch Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNA überprüft. In der frühen stationären Wachstumsphase (nach 54 h) wurden Proben entnommen und die spezifische BgaH-Aktivität der verschiedenen Transformanten mit Hilfe des ONPG-Tests ermittelt.

Tabelle 6. *Hfx. volcanii*-Transformanten, die für die *bgaH*-Reporteranalysen verwendet wurden.

Transformante	pWL102-Konstrukt	pJAS35-Konstrukt
mcA- <i>bgaH</i> - Δ DEF	$P_{mcA^-}bgaH-P_{mcD^-}gvp\Delta DEF$	-
mcA- <i>bgaH</i> - Δ DEF + mcD	$P_{mcA^-}bgaH-P_{mcD^-}gvp\Delta DEF$	mc- <i>gvpD</i>
mcA- <i>bgaH</i> - Δ DEF + Mut1	$P_{mcA^-}bgaH-P_{mcD^-}gvp\Delta DEF$	mc- <i>gvpD</i> _{Mut1}
mcA- <i>bgaH</i> - Δ DEF + Mut6	$P_{mcA^-}bgaH-P_{mcD^-}gvp\Delta DEF$	mc- <i>gvpD</i> _{Mut6}
mcA- <i>bgaH</i> - Δ DEF + Δ p-loop	$P_{mcA^-}bgaH-P_{mcD^-}gvp\Delta DEF$	mc- <i>gvpD</i> _{Δp-loop}
mcA- <i>bgaH</i> - Δ DEF + Δ G-L	$P_{mcA^-}bgaH-P_{mcD^-}gvp\Delta DEF$	mc- <i>gvpD</i> _{ΔG-L}
mcA- <i>bgaH</i> - Δ DEF + AEAE	$P_{mcA^-}bgaH-P_{mcD^-}gvp\Delta DEF$	mc- <i>gvpD</i> _{AEAE}
mcA- <i>bgaH</i> - Δ DEF + 3-ADA	$P_{mcA^-}bgaH-P_{mcD^-}gvp\Delta DEF$	mc- <i>gvpD</i> _{3-ADA}
mcA- <i>bgaH</i> - Δ DEF + 3-AAA	$P_{mcA^-}bgaH-P_{mcD^-}gvp\Delta DEF$	mc- <i>gvpD</i> _{3-AAA}
mcA- <i>bgaH</i> - Δ DEF + Nterm362	$P_{mcA^-}bgaH-P_{mcD^-}gvp\Delta DEF$	mc- <i>gvpD</i> _{Nterm362}
mcA- <i>bgaH</i> - Δ DEF + Cterm356	$P_{mcA^-}bgaH-P_{mcD^-}gvp\Delta DEF$	mc- <i>gvpD</i> _{Cterm356}

Für die mcA-*bgaH*- Δ DEF-Transformante wurde in der stationären Wachstumsphase (nach 54 h) eine spezifische BgaH-Aktivität ermittelt, die im Durchschnitt 1121 ± 120 mU/mg betrug (Abb. 17B, C). Mit der mcA-*bgaH*- Δ DEF+D^{ex}-Transformante wurde eine spezifische BgaH-Aktivität von durchschnittlich 46 ± 19 mU/mg gemessen (Abb. 17B, C). Dies stellt im Vergleich zur mcA-*bgaH*- Δ DEF-Transformante eine Reduktion der BgaH-Aktivität um das 24-fache dar. Weiterhin wurde mit der mcA-*bgaH*- Δ DEF+D_{3-AAA}^{ex}-Transformante eine BgaH-Aktivität von durchschnittlich 5 ± 3 mU/mg ermittelt, was einer 224-fachen Reduktion der BgaH-Aktivität im Vergleich zur mcA-*bgaH*- Δ DEF-Transformante entspricht (Abb. 17B, C). Diese Werte bestätigen, die durch die Western-Analysen erhaltenen Ergebnisse. Hier war die mcGvpE-Proteinmenge in Gegenwart des nativen mcGvpD-Proteins stark reduziert und in Gegenwart des „Super-Repressors“ 3-AAA nicht mehr nachweisbar. Für alle anderen getesteten mcGvpD-Mutanten konnte mittels der Western-Analysen keine Reduktion der mcGvpE-Menge gezeigt werden.

Die mit Hilfe des Reporterensystems ermittelten BgaH-Aktivitäten in mcA-*bgaH*- Δ DEF+ Mut1-, Mut6-, Δ G-L-, AEAE-, 3-ADA-Transformanten lagen unter Berücksichtigung der Standardabweichung alle ungefähr in einem Bereich der BgaH-Aktivität der mcA-*bgaH*- Δ DEF-Transformante oder waren leicht reduziert (Abb. 17B, C). Auch im Fall der mcA-*bgaH*-

Δ DEF+ Δ p-loop-Transformante war die BgaH-Aktivität im Vergleich zur mcA-bgaH- Δ DEF-Transformante leicht, allerdings nicht signifikant reduziert (Abb. 17B, C).

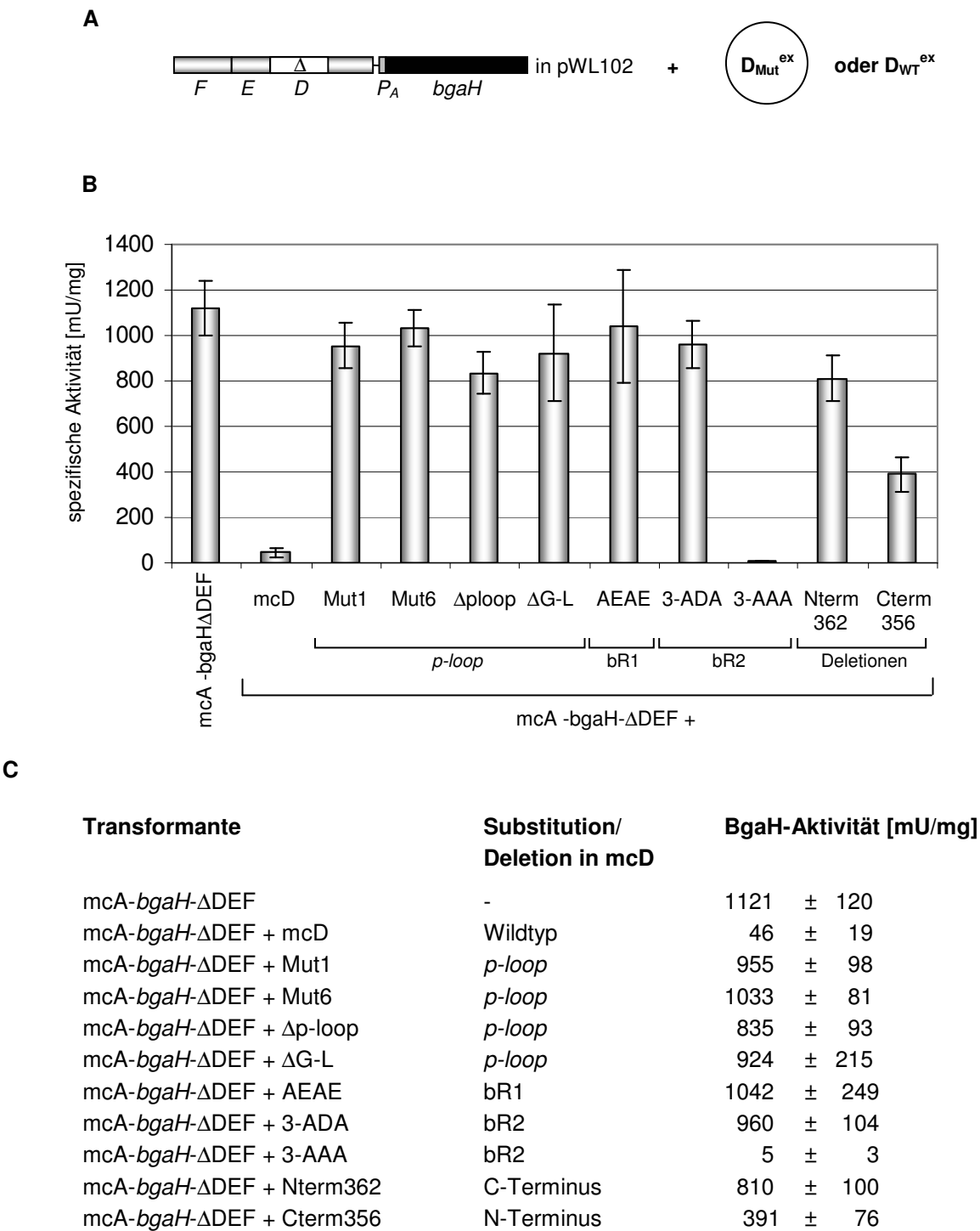


Abb. 17: (A) Schematische Darstellung der beiden für die Bestimmung der BgaH-Aktivitäten verwendeten Plasmidkonstrukte. (B) Graphische Darstellung der spezifischen BgaH-Aktivitäten der *Hfx. volcanii*-Transformanten mit dem Reportergenkonstrukt mcA-bgaH- Δ DEF+D^{ex} oder D_{Mut}^{ex}. Die spezifischen BgaH-Aktivitäten wurden nach einem Wachstum von 54 h bei einer OD_{600nm} von 1,7 bis 2,1 bestimmt und sind in [mU/mg] angegeben. (C) Werte der spezifischen BgaH-Aktivitäten der *Hfx. volcanii*-Transformanten mit dem Reportergenkonstrukt mcA-bgaH- Δ DEF+D^{ex} oder D_{Mut}^{ex}.

Auch die reduzierende Wirkung der Deletionsmutanten Nterm362 (Deletion der C-terminalen Domäne) und Cterm356 (Deletion eines N-terminalen Bereichs) auf die mcGvpE-Menge wurde mittels der Reportergeranalysen untersucht. Die BgaH-Aktivität in der *mcA-bgaH-ΔDEF+Nterm362*-Transformante wies eine leichte Erniedrigung im Vergleich zur *mcA-bgaH-ΔDEF*-Transformante auf. Eine signifikante Erniedrigung der BgaH-Aktivität, im Vergleich zur *mcA-bgaH-ΔDEF*-Transformante um das 2,9-fache, konnte in der *mcA-bgaH-ΔDEF+Cterm356*-Transformante beobachtet werden (Abb. 17B, C).

Die Beurteilung der verschiedenen ermittelten BgaH-Aktivitäten muss unter Berücksichtigung der mcGvpD_{Mut}-Proteinmengen erfolgen, deshalb wurde die Menge der mcGvpD/mcGvpD_{Mut}-Proteine in den verschiedenen Transformanten durch Western-Analysen mit mcGvpD-Antiserum nachgewiesen (Abb. 18). In den *mcA-bgaH-ΔDEF + D_{Mut1}^{ex}, D_{Mut6}^{ex}, D_{Δp-loop}^{ex}, D_{AEAE}^{ex}, D_{3-ADA}^{ex} und D_{Nterm362}^{ex}*-Transformanten konnten ähnliche mcGvpD_{Mut}-Proteinmengen nachgewiesen werden (Abb. 18). Die Proteinmenge von ΔG-L war allerdings erheblich geringer, was sich aber nicht signifikant auf die ermittelte BgaH-Aktivität auswirkte. Ähnlich wie bei den anderen mcGvpD_{Mut}-Proteinen konnte lediglich eine leichte Reduktion der *P_{mcA}*-Aktivität ermittelt werden. Ganz im Gegensatz dazu steht das für die Deletionsmutante Cterm356 erhaltene Ergebnis. Die mittels Reportergeranalysen ermittelte *P_{mcA}*-Aktivität war deutlich reduziert, das Cterm356-Protein konnte mittels Western-Analysen jedoch kaum in den Lysaten der Transformanten nachgewiesen werden (Abb. 18). Somit schien in diesem Fall schon die Anwesenheit einer geringen Cterm356-Proteinmenge auszureichen, um eine Reduktion der Promotoraktivität zu erzielen.

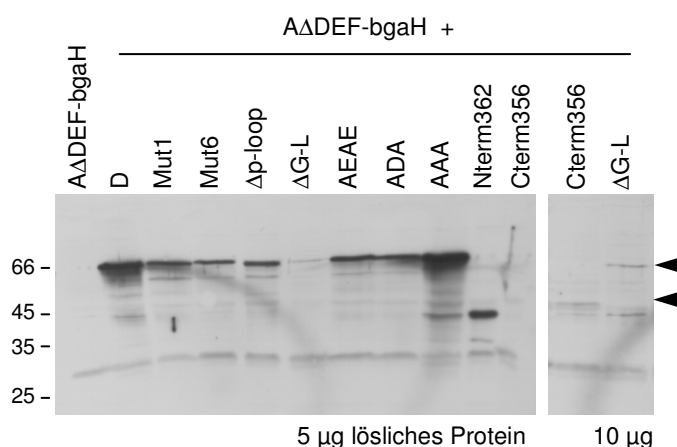


Abb. 18: Western-Analyse zum Nachweis der mcGvpD- und der mcGvpD_{Mut}-Proteine in den verschiedenen *mcA-bgaH-ΔDEF+D_{Mut}^{ex}*-Transformanten. Je 5 µg (links) bzw. 10 µg (rechts) der löslichen Proteine der Transformanten wurden mit einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit mcGvpD-Antiserum inkubiert. Die molaren Massen [kDa] des Protein-Größenstandards sind auf der linken Seite angegeben. Pfeile markieren die detektierten Laufweiten von Cterm356 und ΔG-L.

Dieses Ergebnis stellt eine interessante Beobachtung dar und steht scheinbar im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten Western-Analysen von *D_{Cterm356}+cE^{ex}*-Transformanten. Hierbei war Cterm356 nicht in der Lage, eine Reduktion der cGvpE-Menge in den Transformanten

zu bewirken. Da die Western-Analyse allerdings keine quantitative Methode darstellt, ist es durchaus möglich, dass hier eine geringfügige Reduktion stattfand, die nicht nachgewiesen werden konnte, anhand der Reportergergenanalysen jedoch deutlich wurde. Weiterhin zu berücksichtigen ist hierbei, dass Cterm356 anhand der phänotypischen Betrachtung von $\Delta D + D_{\text{Cterm356}}^{\text{ex}}$ -Transformanten nicht dazu in der Lage war, die Gasvesikelbildung zu reprimieren. Die Untersuchung der mc-gvpA-Transkriptmengen lieferte allerdings kein eindeutiges Ergebnis. Die mc-gvpA-Transkriptmenge schien hier stärker reduziert als im Fall der anderen mcGvpD-Mutanten, auch wenn der Phänotyp deutlich dem eines Gasvesikel-Überproduzenten entsprach. Somit scheint die mcGvpD-Mutante Cterm356 zwar eine verminderte, jedoch nicht vollkommen zerstörte, repressorische Funktion zu besitzen.

Da abgesehen von dieser Mutante alle anderen ermittelten Werte keine signifikanten Unterschiede erbrachten und somit mit Hilfe der Reportergergen-Analysen keine zusätzlichen Informationen über die GvpD-vermittelte Reduktion der GvpE-Menge erhalten werden konnte, wurde diese Analyse zur Quantifizierung der GvpE-Reduktion anhand der P_{mcA} -Aktivierung nicht weiter verfolgt.

4.2.4 *In vivo*-Studien mit $\text{mcD}^{\text{ex}} + \text{cE}_{\text{Mut}}^{\text{ex}} - \text{Hfx. volcanii}$ -Transformanten zur Ermittlung der Funktion konservierter Aspartatreste im cGvpE-Protein

Ziel dieser Versuche war es, die Stabilität verschiedener cGvpE-Mutanten, die Substitutionen konservierter Aspartatreste enthielten (Anderl, 2004), in Gegenwart von mcGvpD zu untersuchen. GvpD besitzt in seiner Aminosäuresequenz ein *p-loop*-Motiv und bindet ATP (Zimmermann, 2003). Aufgrund aller bekannter Eigenschaften der beiden Proteine (GvpE-GvpD-Interaktion und Reduktion der GvpE-Menge in Gegenwart von GvpD) bestand die Vermutung, dass GvpE möglicherweise ähnlich wie der Antwortregulator eines Zwei-Komponenten-Systems an einem Aspartatrest modifiziert werden könnte (Anderl, 2004). Anders als bei Zwei-Komponenten-Systemen könnte diese Modifikation allerdings für die Beeinflussung der Proteinstabilität verantwortlich sein. Für das GvpD-GvpE-Regulatorsystem wurde hier getestet, ob konservierte Aspartatreste von GvpE der Zielort für eine mögliche Modifizierung (eventuell Phosphorylierung) in Folge der Interaktion mit GvpD sind, die sich negativ auf die Proteinstabilität auswirkt. Denkbar wäre auch eine strukturelle Veränderung des GvpE-Proteins durch den Kontakt mit GvpD.

Die Rolle verschiedener konservierter Aspartatreste von cGvpE für die Proteinstabilität, die Interaktionsfähigkeit mit cGvpD und die Aktivierung des P_{cA} -Promotors wurde bereits untersucht (Anderl, 2004). Die cGvpE-Mutanten enthielten jeweils Substitutionen konservierter Aspartatreste zu Alanin: Mut1 (D55A), Mut3 (DD71, 72AA) und Mut5 (D88A) (Anderl, 2004) (Abb. 19). Diese Mutanten werden in ausreichender Menge in *Hfx. volcanii*-

Transformanten produziert und interagieren *in vitro* mit cGvpD (Anderl, 2004). Als Transkriptionsaktivator fungieren Mut1 und Mut3, wohingegen Mut5 die Aktivierungsfähigkeit verloren hat (Anderl, 2004). Die Leserahmen der verschiedenen cGvpE-Mutanten und des nativen cGvpE-Proteins liegen inseriert im pJASt-Vektor vor (Anderl, 2004). Der pJASt-Vektor (Zimmermann nicht veröffentlicht, 2003,) stellt ein Derivat des pJAS35-Vektors dar, der stromabwärts der *Acc65I*-Schittstelle die *p-gvpA*-Terminatorsequenz enthält, die an der Termination der Transkription beteiligt ist und die Stabilität der *p-gvpA*-mRNA erhöht (Hofacker, 2002).

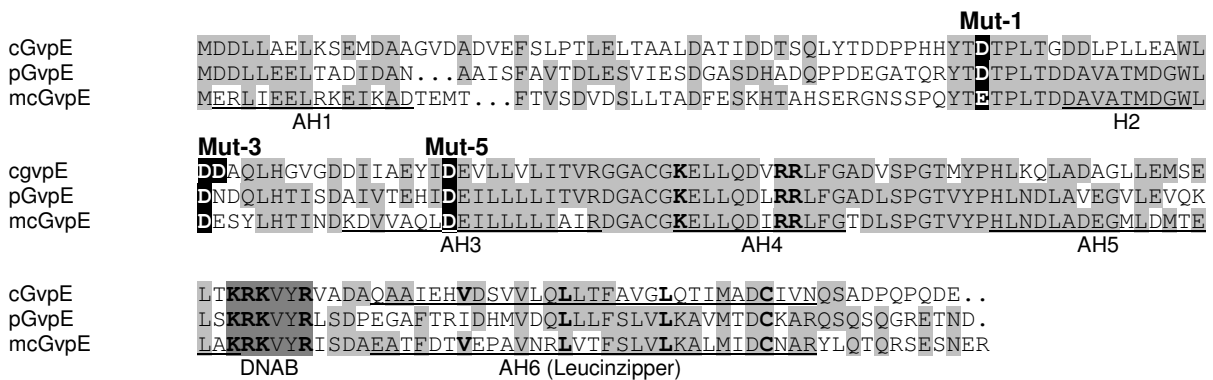


Abb. 19: Alignment der cGvpE-, pGvpE- und mcGvpE-Aminosäuresequenzen und deren Sekundärstrukturvorhersagen (Krüger *et al.*, 1998). Vorhergesagte α -Helices sind unterstrichen und mit H1 bis AH6 bezeichnet (H = Helix, AH = amphiphile Helix). Die DNA-Binderegion (DNAB) ist dunkelgrau hinterlegt. Basische Aminosäuren der AH4-Region und der DNAB, sowie die Aminosäuren der AH6-Region, die das putative Leucinezipper-Motiv bilden, sind fett gedruckt. Identische Aminosäuren sind hellgrau hinterlegt. Die in den hier verwendeten cGvpE-Mutanten ausgetauschten Aspartatreste (Anderl, 2004) sind schwarz hinterlegt.

Hier wurde die Stabilität von der cGvpE-Mutanten cE_{Mut1} , cE_{Mut3} und cE_{Mut5} im Vergleich zum Wildtyp cGvpE (cE_{WT}) bei Anwesenheit von mcGvpD in $cE_{Mut}^{ex} + mcD_{pWL-fdx}$ -Transformanten untersucht. Sollte einer der substituierten Aspartatreste möglicherweise der Ort für die Markierung des cGvpE-Proteins zur Degradation sein, dann sollte die cGvpE-Mutante, deren Aspartat an dieser Stelle durch eine andere Aminosäure substituiert wurde, in $cE_{Mut}^{ex} + mcD_{pWL-fdx}$ -Transformanten stabil und mittels Western-Analysen nachweisbar sein. Die hergestellten Transformanten enthielten das entsprechende *c-gvpE*-Plasmidkonstrukt und den leeren pWL_{fdx} -Vektor, um den Einfluss von pWL_{fdx} in der Zelle auf die cGvpE-Menge zu bestimmen. Als Kontrolle wurde eine cE_{WT} -pJASt-Einzeltransformante verwendet. Weitere Transformanten enthielten das cE_{WT} -pJASt oder cE_{Mut} -pJASt-Konstrukt und das $mcD_{pWL-fdx}$ -Konstrukt, um den Einfluss von mcGvpD auf die cGvpE-Menge zu untersuchen. Die Transformanten wurden in Flüssigkulturen mit Vollmedium für *Hfx. volcanii* angezogen und Proben für Western- und Northern-Analysen während der exponentiellen und stationären Wachstumsphase entnommen. Die Transformanten wurden weiterhin mittels Plasmidisolierung und anschließender Restriktionskontrolle auf Richtigkeit hin überprüft.

Der Vergleich der cGvpE-Menge in den cE_{WT}-pJAS^t- und cE_{WT}-pJAS^t+pWL_{fdx}-Transformanten machte deutlich, dass die Anwesenheit von pWL_{fdx} in den Zellen zu keiner Reduktion der cGvpE-Menge führte (Abb. 20). Die Gegenwart des mcGvpD-Proteins in der cE_{WT}-pJAS^t+mcD_{pWL-_{fdx}}-Transformante verursachte allerdings eine deutliche Reduktion der cGvpE-Menge (Abb. 20). In dieser Transformante war in der exponentiellen Wachstumsphase noch eine geringe cGvpE-Menge und in der stationären Wachstumsphase kein cGvpE mehr mittels Western-Analyse nachweisbar (Abb. 20). Die Western-Analysen der löslichen Proteine der Zelllysate der Transformanten ergaben für alle drei getesteten cGvpE-Mutanten eine starke Reduktion der Proteinmenge in Gegenwart von mcGvpD im Vergleich zu den Kontrolltransformanten mit dem leeren pWL_{fdx}-Vektor. Vergleichbar wie für das native cE_{WT} konnten auch für die untersuchten Mutanten (cE_{Mut1}, cE_{Mut3}, cE_{Mut5}) in den Doppeltransformanten mit mcD_{pWL-_{fdx}} in der exponentiellen Wachstumsphase noch geringe Mengen des cGvpE-Proteins nachgewiesen werden. In der stationären Wachstumsphase dagegen konnte nahezu kein cGvpE_{Mut}-Protein mehr detektiert werden. Die Anwesenheit des mcGvpD-Proteins in den Transformanten wurde mittels Western-Analyse mit mcGvpD-spezifischem Antiserum überprüft (Abb. 20).

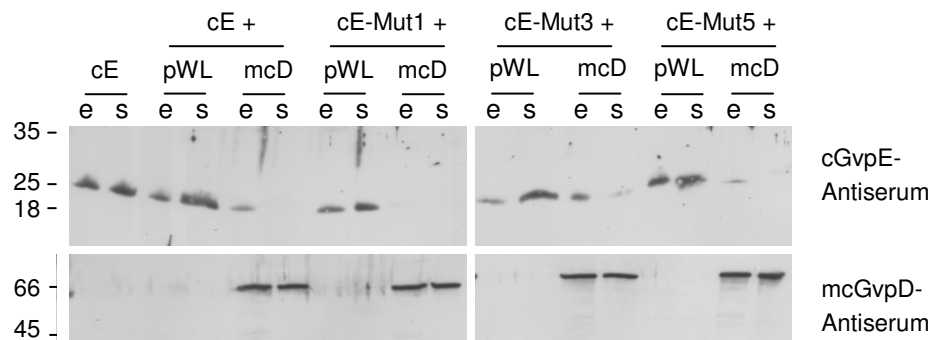


Abb. 20: Western-Analyse zum Nachweis von cGvpE/cGvpE_{Mut} und mcGvpD in cE_{Mut}^{ex}+mcD_{pWL-_{fdx}}-Transformanten. Je 5 µg der löslichen Proteine der Zelllysate der *Hfx. volcanii*-Transformanten aus der exponentiellen (e) und stationären (s) Wachstumsphase wurden mit 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit cGvpE- (oben) oder mcGvpD-spezifischem Antiserum (unten) inkubiert. Die molaren Massen [kDa] des Protein-Größenstandards sind links angegeben.

Um auszuschließen, dass die reduzierten cGvpE-Mengen auf unterschiedliche *c-gvpE*-Transkriptmengen zurückzuführen waren, wurde eine Northern-Analyse mit einer *c-gvpE*-DNA-Sonde durchgeführt. In den cE_{Mut}-pJAS^t+pWL_{fdx} und cE_{Mut}-pJAS^t+mcD_{pWL-_{fdx}}-Transformanten konnten jeweils vergleichbare *c-gvpE*-Transkriptmengen nachgewiesen werden (Abb. 21). Im Vergleich zur cE_{Mut}-pJAS^t-Einzeltransformante wurde in allen Doppeltransformanten allerdings eine leicht reduzierte Transkriptmenge festgestellt (Abb. 21). Insgesamt konnte hier aber erneut gezeigt werden, dass die Reduktion der cGvpE-Menge durch mcGvpD auf der Proteinebene stattfindet.

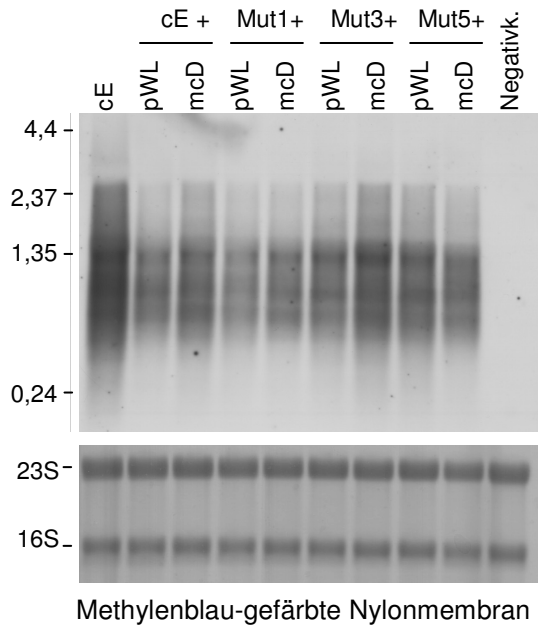


Abb. 21: Northern-Analyse zum Nachweis der *c-gvpE*-Transkripte in den cE_{Mut} -pJAS t +mcD $_{pWL-fdx}$ -Transformanten in der stationären Wachstumsphase. Je 5 μ g Gesamt-RNA wurden elektrophoretisch in einem denaturierenden 1,2%igen Agarose-Formaldehydgel auftrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer *c-gvpE*-DNA-Sonde hybridisiert. Die Methylenblau-gefärbte Nylonmembran zur Kontrolle der Qualität und Quantität der Gesamt-RNA (hier: Visualisierung der 16S- und 23S-rRNA) ist darunter gezeigt. Auf der linken Seite ist der RNA-Größenstandard [kb] angegeben.

4.3 Untersuchungen zur Quartärstruktur von mcGvpD

4.3.1 Native Produktion und Reinigung von Gvp_{his}-Proteinen aus *Hfx. volcanii* WFD11

Für die Analysen zur Quartärstruktur des mcGvpD-Proteins sollte neben dem heterolog in *E. coli* produzierten mcGvpD_{his}-Protein auch ein mcGvpD_{his}-Protein verwendet werden, dass unter nativen Bedingungen in *Hfx. volcanii* WFD11 produziert wurde. Die Produktion und Reinigung der Gvp_{his}-Proteine erfolgte nach einem Protokoll von Peter Zimmermann mit Modifikationen (siehe Kapitel 3.3.8.4). Auch wenn die Reinigung von Gvp_{his}-Proteinen aus *Hfx. volcanii* bereits dokumentiert wurde, werden die hier erzielten Reinigungserfolge nochmals dargestellt, da sie für die weiteren Analysen wichtig sind.

Die Expression von *his-gvp*-Leserahmen in *Hfx. volcanii* WFD11 unter der Kontrolle des *fdx*-Promotors liefert im Vergleich zur Produktion in *E. coli* wesentlich geringere Proteinmengen, weshalb bisher meistens auf die rekombinante Herstellung in *E. coli* und anschließende Rückfaltung mittels Dialyse in Hochsalzbedingungen zurückgegriffen wurde. Für das TBP-Protein aus *Hbt. salinarum* und für die Glucose-Dehydrogenase aus *Hfx. mediterranei* konnte gezeigt werden, dass diese nach heterologer Produktion, denaturierender Reinigung in 8 M Harnstoff und anschließender Überführung in Puffer mit einer Salzkonzentration von ≥ 2 M NaCl funktionell vorlagen (Soppa & Link, 1997; Pire *et al.*, 2001). Die native Konformation der Glucose-Dehydrogenase konnte anhand ihrer enzymatischen Aktivität überprüft werden. Eine Kontrolle der nativen Konformation anhand eines enzymatischen Tests kann für die beiden Proteine GvpD und GvpE allerdings nicht durchgeführt werden.